

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : Biologie des organismes

Par

Javier Ernesto PITTI CABALLERO

**Nanoencapsulation d'un agent synergisant chimique, la deltaméthrine
pour potentialiser l'effet d'un insecticide, l'indoxacarbe
contre les insectes nuisibles**

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 24 avril 2019
Unité de recherche : *Laboratoire "Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et Récepteurs"*
(SiFCIR) UPRES EA 2647/USC INRA 1330, SFR 4207 QUASAV

Rapporteurs avant soutenance :

Mr Luc BELZUNCES
Directeur de recherche
INRA – Centre PACA, Avignon

Mr Fabrice CHANDRE
Chargé de recherche,
IRD, Montpellier

Composition du Jury :

Directrice de thèse : Mme Véronique APAIRE-MARCHAIS
Professeur, Université d'Angers

Co-directeur de Thèse : Mr Bruno LAPIED
Professeur, Université d'Angers

Encadrant : Mr Guillaume BASTIAT
Maître de conférences,
Université d'Angers

Examinatrice : Mme Ruxandra GREF
Directrice de recherche
CNRS, Orsay

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier grandement et exprimer ma sincère reconnaissance à ma directrice de thèse Madame le Professeur Véronique Apaire-Marchais de m'avoir fait l'honneur d'accepter la direction de ce projet de thèse. J'ai apprécié énormément la rigueur de son travail, sa très grande et longue expérience dans la recherche, ainsi que dans l'enseignement et sa compétence scientifique durant ces années de doctorat. Je vous remercie pour votre disponibilité et vos conseils tout au long de ce projet. Je suis également très sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur le Professeur Bruno Lapied, comme co-directeur de thèse. Merci pour m'avoir fait participer à un travail de recherche si intéressant, pour avoir partagé vos connaissances, vos énormes compétences scientifiques et vos expériences, toujours dans une ambiance positive et dans la bonne humeur. Merci à tous les deux pour l'attention et surtout le temps que vous m'avez consacré malgré vos nombreuses responsabilités. Ce travail de thèse, ainsi que la rédaction de ce manuscrit n'auraient jamais existé sans votre soutien. Tous vos conseils me seront très précieux à l'avenir.

Il est très agréable d'exprimer toute ma gratitude à Madame le Professeur Valérie Raymond pour m'avoir accueilli chaleureusement et m'avoir permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions de travail au sein du Laboratoire SiFCIR (Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et Récepteurs UPRES EA 2647/USC INRA 1330). Merci pour votre gentillesse, votre confiance et l'enthousiasme que vous m'avait manifesté pendant ces années de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Guillaume Bastiat, qui m'a encadré pendant ces années de thèse. Merci d'avoir partagé ses connaissances scientifiques, sa disponibilité, sa patience, son soutien et de m'avoir initié aux techniques de nanoencapsulation dans le Laboratoire MiNT (Micro et Nanomédecines Translationnelles MINT - INSERM U1066 / CNRS 6021).

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Corinne Lefrancois, une excellente collaboratrice et membre de l'équipe de recherche, qui m'a accompagné pendant toutes les étapes de mon projet de thèse. Je te remercie énormément Corinne pour ton temps, ton soutien et ton encouragement.

Je tiens à remercier Madame Ruxandra Gref, Directrice de recherche à CNRS de l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'être examinatrice de ce travail de thèse.

Je remercie énormément à Monsieur Luc Belzunces, Directeur de recherche, INRA Avignon, pour l'honneur qu'il me fait d'être dans mon jury de thèse. Je tiens à remercier également à Monsieur Fabrice Chandre, Chargé de recherche, de l'IRD Montpellier pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je vous remercie tous les deux d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Un grand merci à tous mes collègues du laboratoire pour leur soutien et leurs conseils au cours de la thèse. J'ai eu beaucoup de plaisir de travailler avec une équipe comme vous. Un merci particulier à Luzia Bossé pour l'aide que tu m'as apportée dans mes démarches administratives, mais aussi pour ton amitié et ta bienveillance. Je tiens à remercier Delphine Goven, pour sa disponibilité permanente, Josy-Anne Froger, pour son soutien et sa bonne humeur quotidienne. Je tiens à remercier Caroline Deshayes pour avoir aussi partagé ses connaissances avec moi. Merci à Véronique Jean pour l'aide qu'elle m'a apportée depuis mon arrivée au laboratoire SiFCIR et particulièrement avec l'élevage de blattes. Merci à Jeremy Camon pour ses conseils et échanges. Merci également à Barbara pour partager des bons moments dans le laboratoire pendant son stage. Je tiens à remercier aussi Alessia de Chiara, Delphine Calas-List et Olivier List, pour les échanges avec eux depuis mon arrivée au laboratoire.

Je n'oublierai pas mes collègues de travail, mais aussi de sport, et surtout des grands amis. Je voudrais remercier Marine El Adouzi pour tous les conseils, l'amitié et le soutien. Je remercie énormément Eléonore Moreau pour son amitié, sa disponibilité et son soutien dans le laboratoire et en dehors. Un très grand merci à Julie-Anne Hugel, pour sa bonne humeur, sa disponibilité illimitée, son amitié, pour m'avoir encouragé tout le temps et surtout pour m'avoir pris comme un membre de sa famille.

Bien entendu je remercie tous les doctorants du laboratoire que j'ai rencontrés durant mon séjour au laboratoire et à ceux qui sont actuellement dans le laboratoire. Je tiens à remercier Alexandre Bantz, avec qui je partage ces dernières années le bureau, ce fut un véritable plaisir, merci pour ton aide et ta disponibilité. Je tiens à remercier Alexandre Pilon et Stéphane Perrier qui ont commencé leurs stages de master au laboratoire et qui sont maintenant doctorants, pour tous les échanges, leur soutien et leur amitié, ainsi que pour garantir toujours une bonne ambiance de travail et convivialité. Je vous souhaite à tous les trois une bonne continuation.

Je vous souhaite à tous une belle et longue carrière dans ce laboratoire et dans la recherche en générale.

Je voudrais exprimer ma gratitude aussi à mes deux stagiaires Olivia Drapeau et Florian Beignon avec qui j'ai travaillé pendant ces années de thèse, leurs contributions à ce travail étaient très importantes.

Je voudrais remercier aussi Julie Fouchet pour les cours de langue française que j'ai pris au Centre de Langue Française pour Etrangers (CeLFE) de l'Université d'Angers depuis le début de ma thèse.

Je ne peux nommer ici toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidé et encouragé mais je les en remercie vivement.

Le travail de recherche présenté dans ce mémoire a été financé par le Secrétariat de Science, technologie et de l'innovation du Panama (SENACYT) dans le cadre d'un programme éducatif des études avec la Société Française d'Exportation des Ressources Éducatives (SFERE). J'exprime à ces deux organismes ma sincère gratitude. Je souhaite également remercier Madame Anna Maneta, ainsi que Monsieur Georges Rodriguez pour le soutien et la surveillance tout au long de ma thèse comme représentants du programme à Paris.

Je tiens à remercier la direction générale de l'Institut de Recherche Agricole du Panama (IDIAP) pour m'avoir libéré de mes responsabilités comme assistant de recherche dans la production de semences de pomme de terre au Panama pendant mes études de doctorat en France.

La famille est la base, le mérite de ce travail revient à mes parents, ma mère Mirtha Caballero de Pitti, à mon père Javier Pitti Castillo, et à ma sœur Sylvia Pitti Caballero, merci de m'encourager et d'avoir toujours cru en moi.

Ce travail de thèse est dédié en hommage à ma grand-mère Felicia Caballero Rojas, ses enseignements m'accompagneront le reste de ma vie.

Table des matières

Remerciements	ii
LISTE DES ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	11
PARTIE 1 : LUTTE CONTRE LES INSECTES RAVAGEURS	13
1. Contexte	13
2. Lutte chimique	15
2.1. Substances actives de synthèse	16
2.2. Les insecticides qui ciblent les canaux sodium dépendants du potentiel	17
2.2.1. Les pyréthrinoides	18
2.2.2. Les oxadiazines	20
3. Mécanismes de résistances aux insecticides	23
3.1. Résistance métabolique.....	24
3.2. Résistance par modification de la cible.....	25
3.3. Résistance comportementale	28
3.4. Résistance cuticulaire.....	28
4. Stratégies alternatives de lutte	29
4.1. Les agents synergisants	30
4.2. Mécanismes intracellulaires impliqués dans l'augmentation de la sensibilité des cibles membranaires aux insecticides.....	32
5. Objectif du travail de thèse	34
PARTIE 2 : MISE EN EVIDENCE <i>IN VIVO</i> DE L'EFFET SYNERGISANT DE LA DELTAMETHRINE POUR POTENTIALISER L'EFFET DE L'INDOXACARBE	35
1. Contexte et position du problème	35
2. Matériels et méthodes	37
2.1. Modèle biologique : <i>Periplaneta americana</i>	37
2.2. Etudes <i>in vivo</i> : exposition aux insecticides	39
2.2.1. Insecticides et produits pharmacologiques utilisés	39
2.2.2. Protocole d'intoxication des blattes.....	39
2.2.3. Analyse des données	42
3. Résultats	43
3.1. Détermination de la concentration la plus faible de deltaméthrine utilisée comme agent synergisant	43

3.2.	Effet synergique de l'association de la deltaméthrine avec l'indoxacarbe.....	44
4.	Conclusion	46
PARTIE 3 : NANOENCAPSULATION DE LA DELTAMETHRINE		47
1.	Contexte et position du problème	47
1.1.	Les nanoparticules en agriculture	48
1.2.	Insecticides encapsulés	49
1.3.	Objectifs du travail	53
2.	Matériel et Méthodes	54
2.1.	Matériel	54
2.2.	Formulation des nanocapsules lipidiques et des nanocapsules lipidiques chargées en deltaméthrine.....	54
2.3.	Purification des nanocapsules lipidiques	55
2.4.	Etude de la stabilité des nanocapsules lipidiques chargées en deltaméthrine : effet du temps et du pH	56
2.5.	Etude de la dégradation par les estérases de la deltaméthrine et de la deltaméthrine nanoencapsulée.....	56
2.6.	Caractérisation par diffusion de la lumière	56
2.7.	Caractérisation par chromatographie	57
3.	Résultats	58
3.1.	Les nanocapsules lipidiques et les nanocapsules lipidiques chargées en deltaméthrine.....	58
3.2.	Stabilité des nanocapsules lipidiques en fonction du pH.....	59
3.3.	Protection de la deltaméthrine des estérases par les nanocapsules lipidiques.....	60
4.	Conclusion	62
PARTIE 4 : MISE EN EVIDENCE <i>IN VIVO</i> DE L'OPTIMISATION DE L'EFFET SYNERGIQUE PAR LA NANOENCAPSULATION DE LA DELTAMETHRINE		63
1.	Etude comparative des effets de la deltaméthrine seule par rapport à la deltaméthrine nanoencapsulée	63
2.	Optimisation de l'effet de l'indoxacarbe par la deltaméthrine nanoencapsulée.....	65
3.	Etude comparative des effets produits par les combinaisons deltaméthrine / PBO / indoxacarbe et LNC-deltaméthrine / indoxacarbe.....	66
4.	Conclusion	68
PARTIE 5 : DISCUSSION – PERSPECTIVES		69
1.	Intérêt de la nanoencapsulation de la deltaméthrine pour améliorer l'efficacité de l'association deltaméthrine / indoxacarbe.....	69

2. Stratégie de nanoencapsulation pour l'application sur champs des mélanges deltaméthrine / indoxacarbe.....	72
PARTIE 6: CONCLUSION GENERALE	74
LISTE DES FIGURES	76
LISTE DES TABLEAUX	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	81

Liste des abréviations

- CaMkinase II** : Protéine kinase calcium/calmoduline dépendante de type II
- CdCl₂** : Chlorure de cadmium
- CE₂₀** : Concentration Efficace qui produit 20% de l'effet maximum
- CE₅₀** : Concentration Efficace qui produit 50% de l'effet maximum
- CL** : Concentration létale
- CNEV** : Centre National d'Expertise sur les Vecteurs
- CYP P450** : Cytochrome P450 monooxygénases
- DCJW** : *N*-decarbométhoxylé JW062
- DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane
- DEET** : *N*, *N*-diethyl-*m*-toluamide
- DEF** : *S,S,S*-tributyl phosphorotrithioate
- DLT** : Deltaméthrine
- DMSO** : Diméthylsulfoxyde
- DUM** : Dorsal Unpaired Median
- EC** : Emulsion Concentrée
- EE**: Efficacité d'encapsulation
- FAO** : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
- GST**: Glutathion S-Transférase
- IC** : Indice de combinaison
- IND** : Indoxacarbe
- IR3535** : Insect repellent 3535
- IRAC** : Insecticide Resistance Action Committee
- Kb-R7943** : 2-[2-[4-(4-nitrobenzyloxy)phenyl]ethyl]isothiouréa methanesulfonate
- Kdr** : Knock-down resistance
- LNC** : Nanocapsule blanche
- LNC-DLT** : Deltaméthrine nanoencapsulée
- NCX_{INV}** : Echangeur Na/Ca, mode inverse
- NPIC** : National Pesticide Information Center
- OCDE** : Organisation de Coopération et de Développement Economique
- OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- PA** : Potentiel d'action

PBO : Piperonyl Butoxide

PdI : Indice de polydispersité

PKA : Protéine Kinase dépendante de l'AMPc

PKC : Protéine Kinase C

PKG : Protéine Kinase dépendante du GMPc

PP1-2A : Protéine Phosphatases de types 1-2A

SiO₂ : Dioxyde de silicium

SNC : Système Nerveux Central

TiO₂ : Dioxyde de titane

TTX : Tétrodotoxine

Z-ave : Diamètre hydrodynamique

ZnO : Oxyde de zinc

Introduction

Les insectes représentent la plus grande population dans le monde animal. Dans les écosystèmes, le rôle des insectes est fondamental puisqu'ils interviennent dans les chaînes alimentaires et participent dans diverses activités pour l'environnement, telle que la pollinisation. Il a été déterminé que 60% des oiseaux dépendent des insectes pour se nourrir, tandis que 80% des plantes sauvages dépendent des insectes pollinisateurs (Nuruzzaman *et al.*, 2016). Certains insectes (10 000 espèces environ) apparaissent comme nuisibles (par exemple : les pucerons, les cochenilles les aleurodes, les cicadelles, les mouches, les chenilles, etc.) en induisant des effets phytopathogènes et donc une diminution de la qualité et des rendements des productions agricoles.

La protection des cultures représente un enjeu majeur pour la qualité des productions agricoles et nécessite l'usage des pesticides qui est indispensable pour réduire efficacement le nombre des insectes ravageurs des cultures, les maladies des plantes, la prolifération des mauvaises herbes. Chaque année, les ravageurs de culture et les maladies des plantes détruisent jusqu'à 40% des récoltes mondiales et ces pertes pourraient être plus importantes sans l'utilisation de pesticides (Huang *et al.*, 2018). Cependant l'utilisation non raisonnée des pesticides a augmenté la capacité des insectes à développer des mécanismes de résistance contre les insecticides. (Davies *et al.*, 2007).

Selon Casida (2017), plus de 800 pesticides sont utilisés pour la protection des cultures. La consommation mondiale de pesticides est d'environ 2,5 millions de tonnes par an dont 45% sont utilisés uniquement en Europe, 25% aux États-Unis, l'Inde avec 3,75% et un peu plus du 25% dans le reste du monde (De Arnab *et al.*, 2014). Suite aux polémiques dues aux problèmes engendrés par l'utilisation de manière abusive des pesticides, la loi de programmation Ecophyto I, initié à la suite du Grenelle Environnement en 2008, propose un cadre réglementaire pour diminuer de 50%, l'utilisation de produits phytosanitaires en zones agricoles dans les 10 ans. Suite à l'absence de résultats satisfaisants, un plan Ecophyto II a été proposé en 2015 jusqu'à l'échéance 2025. Les principaux objectifs de ce plan proposent un accompagnement de la recherche dans ce domaine pour développer des stratégies innovantes afin de réduire la quantité de produits phytosanitaires tout en conservant ou en augmentant leur efficacité et pour réduire les effets sur les organismes non-cibles et protéger l'environnement (Plan Ecophyto II 2025, Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt

<http://agriculture.gouv.fr/ecophyto>). Aujourd'hui, la recherche scientifique se concentre sur le développement des nanotechnologies qui pourraient constituer une alternative efficace pour améliorer l'efficacité des traitements en agriculture. (Campos *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2018).

L'objectif de ce projet de thèse est de développer une stratégie innovante pour optimiser l'efficacité des insecticides tout en réduisant les doses. Ce travail est basé sur la nanoencapsulation d'un pyréthrianoïde (deltaméthrine), utilisé non pas comme un insecticide mais comme un agent synergisant, associé à un insecticide de la famille des oxadiazines (indoxacarbe). Dans ce cas, l'agent synergisant est utilisé pour augmenter l'efficacité de l'insecticide en activant les voies de signalisation intracellulaires dépendantes du calcium, responsables de l'augmentation de la sensibilité des cibles membranaires aux insecticides.

L'hypothèse de ce travail de thèse repose sur l'effet synergique de l'association deltaméthrine / DCJW qui a été obtenu *in vitro*, au laboratoire SiFCIR, sur neurones de blattes et qui a fait l'objet d'un brevet (Flochlay-Sigognault *et al.*, 2014). Ces résultats prometteurs ont motivé l'étude de cette association *in vivo* sur la blatte (*Periplaneta americana*) et l'optimisation de cette association avec une technique de nanoencapsulation.

Partie 1 : Lutte contre les insectes ravageurs

1. Contexte

L'agriculture nécessite le développement constant de nouvelles stratégies pour contrôler efficacement les insectes ravageurs des cultures. La production agricole fournit à la population des matières premières importantes pour l'alimentation et la santé (Carvalho, 2017). D'après le rapport des Nations Unis : *World Population Prospects : 2017* (United Nations, 2017) la population mondiale est passée de 2,5 milliards en 1950 à 6 milliards en l'an 2000 et elle devrait atteindre 9,8 milliards à 2050 et 11,2 milliards d'ici 2100 (Figure 1).

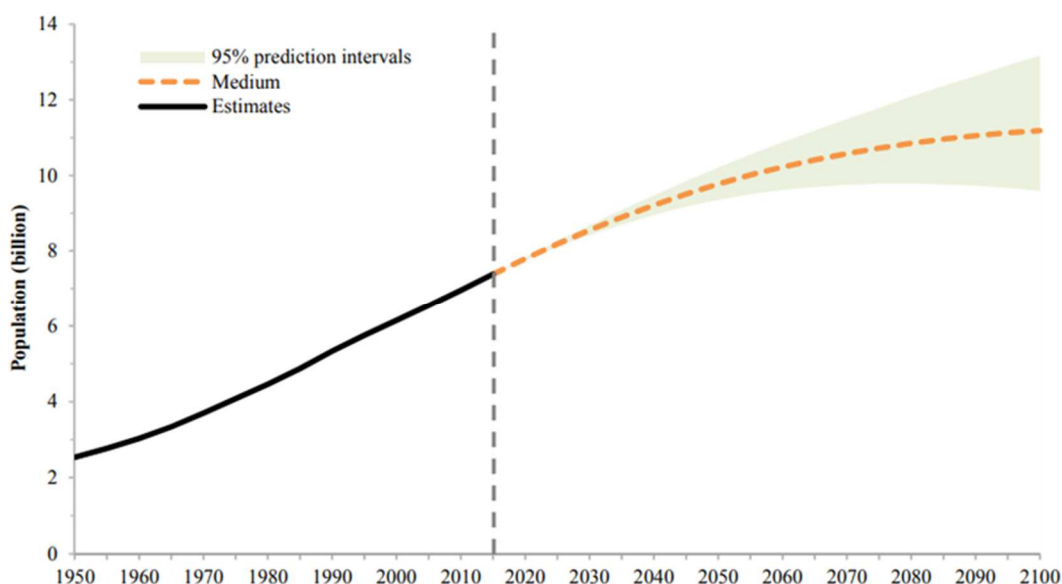


Figure 1: Estimations de la croissance de la population mondiale entre 1950 et 2100

(United Nations, 2017)

Pour répondre à cette attente, l'utilisation de produits phytosanitaires constitue pour le moment la seule alternative pour subvenir aux besoins alimentaires de la population mondiale croissante. Les produits phytosanitaires regroupent plusieurs familles de produits dont les principaux sont les fongicides, les herbicides et les insecticides (Figure 2).

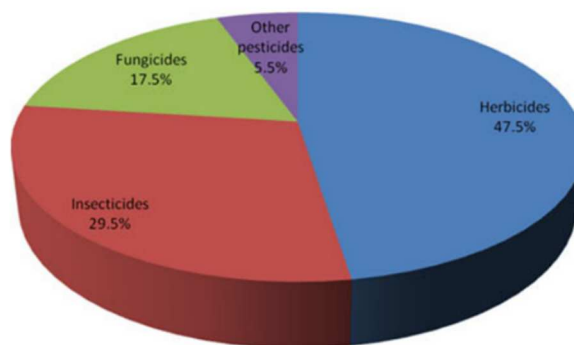


Figure 2: Marché des pesticides au niveau mondial (De Arnab et al., 2014)

Selon la FAO, l'invasion des ravageurs dans l'agriculture coûte des milliards de dollars chaque année dans la production agricole et provoque des pertes considérables dans les rendements des cultures en détruisant plus de 10% des récoltes mondiales (Sharma et al., 2017). Malheureusement des études montrent que beaucoup de ces produits phytosanitaires sont maintenant interdits, car ils ont des effets secondaires sur l'homme et les organismes non-cibles.

Les statistiques sur les ventes de pesticides sont utilisées comme indicateurs de la consommation de pesticides en agriculture. Parmi les 20 États membres de l'Union européenne (UE), l'Espagne, la France, l'Italie et l'Allemagne représentent une grande majorité (79%) des ventes de pesticides déclarées en 2016 (Figure 3)(Eurostat, 2016).

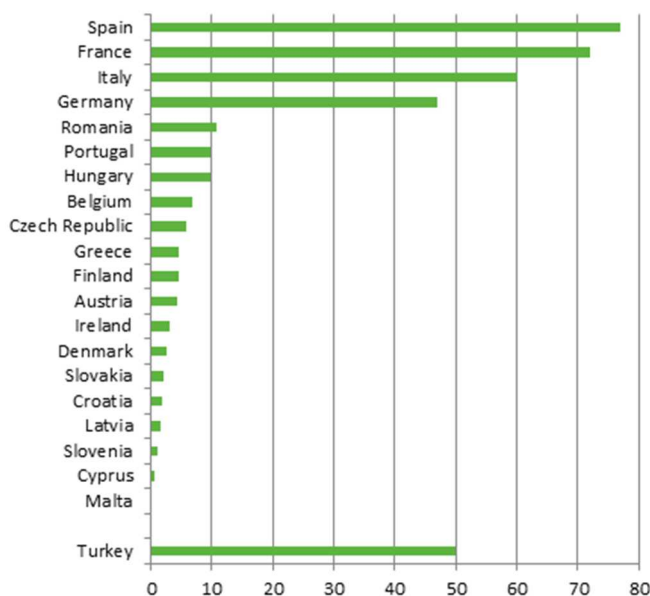


Figure 3: Ventes des pesticides dans l'Union européenne 2016 (millions de kilogrammes) (d'après Eurostat, 2016)

Selon les chiffres délivrés par Eurostat (2016), la France a consommé en 2016, plus de 70000 tonnes, ce qui la place actuellement au deuxième rang des pays européens en matière de consommation de pesticides. Par conséquent il est nécessaire de développer des stratégies alternatives pour diminuer les quantités de produits phytosanitaires utilisées tout en optimisant l'efficacité des traitements pour (1) augmenter la qualité des productions agricoles et (2) réduire les effets non intentionnels sur l'environnement et les organismes non-cibles.

2. Lutte chimique

De nos jours, parmi les moyens de lutte contre les insectes ravageurs des cultures à savoir physique (e.g., mécanique, thermique, électromagnétique) et biologiques (virus, bactéries, champignons) (Deshayes *et al.*, 2017), la lutte chimique représente le principal moyen de contrôle et de gestion des insectes ravageurs des cultures (Figure 4). Elle consiste à utiliser des produits phytosanitaires (les insecticides) contre les ravageurs des cultures. Les insecticides sont des « substances naturelles ou de synthèse capables d'éliminer ou d'empêcher la reproduction des insectes jugés indésirables ».

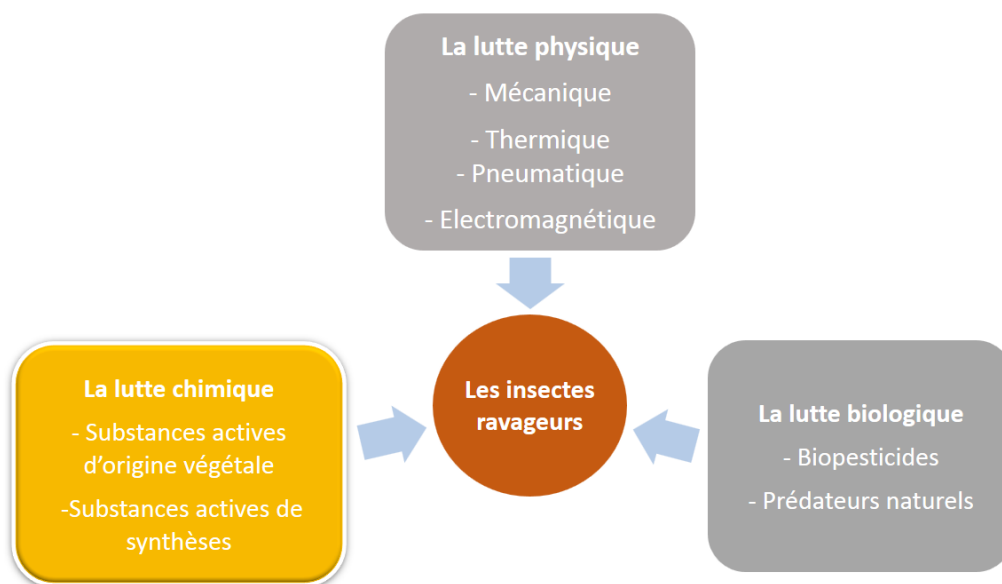


Figure 4: Moyens de lutte contre les insectes ravageurs.

2.1. Substances actives de synthèse

Les insecticides sont des molécules ayant des effets neurotoxiques. Depuis les années 1940, différentes familles d'insecticides ont été utilisées comme les organophosphorés, les carbamates, les phénylpyrazoles, les pyréthrinoides, les oxadiazines et les néonicotinoïdes, avec des modes d'action différents sur le système nerveux central des insectes (Casida et Durkin, 2013; Casida, 2017) (Tableau 1).

Tableau 1: Principales familles d'insecticides agissant sur des cibles de la membrane plasmique (modifié d'après Apaire-Marchais et al., 2016).

Classes d'insecticides	Cibles moléculaires	Effets	Références
Pyréthrinoides	Canaux sodium dépendants du potentiel	Ouverture prolongée des canaux sodium dépendants du potentiel	Casida et Durkin (2013), Silver et al. (2017)
Oxadiazines		Inhibition des canaux sodium dépendants du potentiel	Silver et al. (2017)
Organophosphorés	Acétylcholinestérases	Inhibition par phosphorylation	Casida et Durkin (2013)
Carbamates		Inhibition par carbamoylation	Casida et Durkin (2013)
Néonicotinoïdes	Récepteurs cholinergiques de type nicotinique	Effet agoniste	Casida et Durkin (2013) Casida (2018)
Buténolides			Nauen et al. (2015) Ihara et al. (2017)
Sulfoximines			Sparks et al. (2013) Ihara et al. (2017)
Mésioioniques		Effet antagoniste	Holyoke et al. (2017)
Phénylpyrazoles	Récepteurs GABAergiques ionotropes	Effet antagoniste	Ozoe et al. (2015)
Isoxazolines			Ozoe et al. (2015), Casida et Durkin (2015)

Dans ce travail de thèse, nous nous limiterons principalement aux insecticides qui agissent sur le canal sodium dépendant du potentiel, les pyréthrinoides et les oxadiazines.

2.2. Les insecticides qui ciblent les canaux sodium dépendants du potentiel

Les canaux sodium dépendants du potentiel sont des glycoprotéines transmembranaires essentielles à la conduction électrique dans les cellules excitables. Ils constituent donc la principale cible d'un large éventail de substances neurotoxiques telles que les insecticides (Silver *et al.*, 2014). Du point de vue fonctionnel, l'ouverture de ces canaux ioniques est responsable de la phase de dépolarisation du potentiel d'action (Dong *et al.*, 2014). L'inactivation du courant sodium, quant à elle, participe à la phase de repolarisation avec l'ouverture des canaux K^+ (Figure 5).

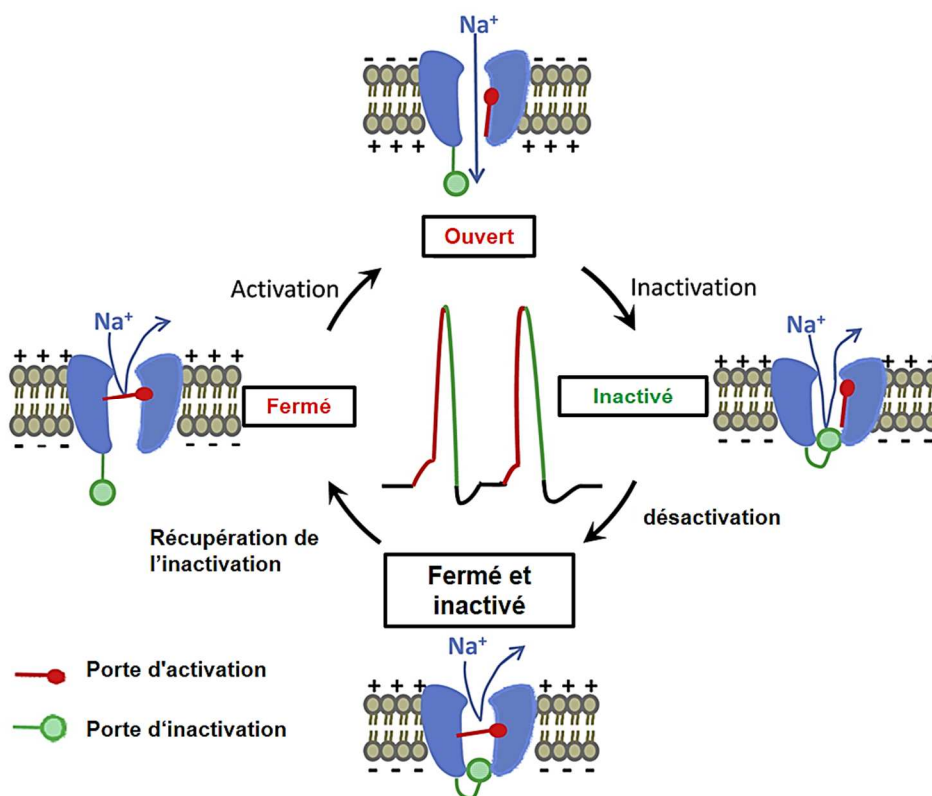


Figure 5: Le canal sodium dépendant du potentiel peut se présenter sous différents états : fermé, ouvert, inactivé. Au repos, la porte d'activation (rouge) est fermée et la porte d'inactivation (verte) est ouverte. Lors d'une dépolarisation, le canal sodium passe de l'état fermé à l'état ouvert, c'est l'activation qui permet de générer un influx d'ions sodium. Durant la dépolarisation, la porte d'inactivation se ferme. Ce mécanisme participe à la phase de repolarisation du potentiel d'action. A la fin du potentiel d'action, les portes d'activation et d'inactivation sont fermées. Il faut attendre

un certain temps pour que la porte d'inactivation retrouve sa position initiale, c'est la réactivation (D'après Dong et al., 2014).

Les canaux sodium dépendants du potentiel représentent la principale cible des pyréthrinoides et des oxadiazines. Les pyréthrinoides agissent en modifiant la durée d'ouverture des canaux sodium dépendants du potentiel, provoquant une queue de courant de désactivation très importante (Soderlund, 2012). Les oxadiazines agissent en inhibant l'ouverture des canaux sodium dépendants du potentiel (Lapied et al., 2001; Wing et al., 2000, Silver et al., 2017).

Dans le cadre de ce travail de thèse une attention particulière est portée sur les effets de deux insecticides qui ciblent le canal sodium dépendant du potentiel : un insecticide de la famille des pyréthrinoides (la deltaméthrine) et un pro-insecticide de la famille des oxadiazines (l'indoxacarbe).

2.2.1. Les pyréthrinoides

Les insecticides pyréthrinoides sont des molécules de synthèse analogues aux pyréthrines, ensembles de métabolites secondaires des fleurs de chrysanthèmes (*Tanacetum cinerariifolium*). Dans la nature les pyréthrines ont une action insecticide caractérisée par une hyperactivité et des convulsions chez la plupart des insectes, ceci résultant d'un dysfonctionnement des canaux sodium dépendants du potentiel (Silver et al., 2014). Les pyréthrines sont connues pour être photosensibles. Cependant, pour remédier à cette propriété physico-chimique, des analogues synthétiques photostables, à savoir les pyréthrinoides, ont été élaborés dans les années 1970 (Elliott, 1971). Les pyréthrinoides sont couramment utilisés en agriculture en raison de leur forte toxicité pour les insectes et de leur faible risque pour les mammifères. Une des différences s'explique par un effet dépendant de la température puisqu'il a été constaté que l'efficacité des pyréthrinoides est plus importante à basse température, entre 15-20 °C, température des insectes (Narahashi, 2000).

2.2.1.1. Classification et structure

Les pyréthrinoides sont classés en type I et type II, en fonction de leur structure chimique (présence ou non d'une liaison α -cyanée), de leur mode d'action sur le canal sodium et de leurs symptômes chez l'insecte. Concernant la structure chimique, les

pyréthrinoides sont des molécules formées généralement d'un groupe acide et d'un groupe alcool reliés par une liaison ester. Les pyréthrinoides de type I, par exemple la perméthrine, sont dépourvus de la liaison α -cyanée alors que les pyréthrinoides de type II, par exemple la deltaméthrine, portent cette liaison (Casida et Durkin, 2013) (Figure 6).

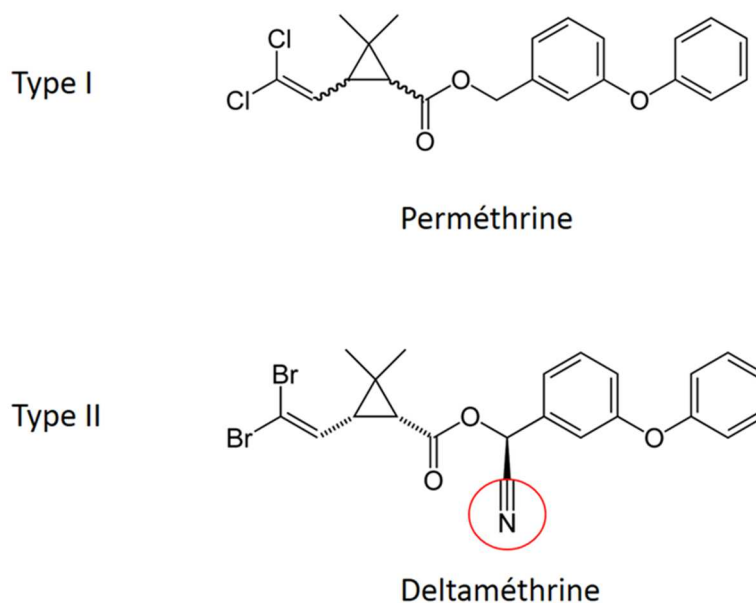


Figure 6: Structures chimiques des pyréthrinoides de type I et II

2.2.1.2. Mode d'action et symptômes d'intoxication

Les pyréthrinoides sont des composés synthétiques ayant pour cible les canaux sodium dépendants du potentiel. Ils sont considérés comme l'une des premières substances actives synthétiques identifiées pour agir dans les canaux sodiques (Dong *et al.*, 2014; Raymond-Delpech *et al.*, 2005, Field *et al.*, 2017). Ces insecticides affectent à la fois le système nerveux périphérique et le système nerveux central des insectes. Les pyréthrinoides de type I (i.e. perméthrine) prolongent la durée d'ouverture des canaux sodium dépendants du potentiel et génèrent un courant de queue entrant consécutif au ralentissement de l'état d'ouverture du canal sodium. Cet effet se traduit par une activité électrique répétitive, c'est-à-dire une augmentation de la fréquence de décharge des potentiels d'action (Casida et Durkin 2013, Silver *et al.*, 2014; Field *et al.*, 2017) (Figure 7). Les pyréthrinoides de type II (i.e., deltaméthrine) prolongent également la durée d'ouverture des canaux sodium dépendants du potentiel mais qui se traduit par une

dépolarisation à l'état stable importante, conduisant à une inhibition de la genèse des potentiels d'action (Casida et Durkin 2013) (Figure 7).

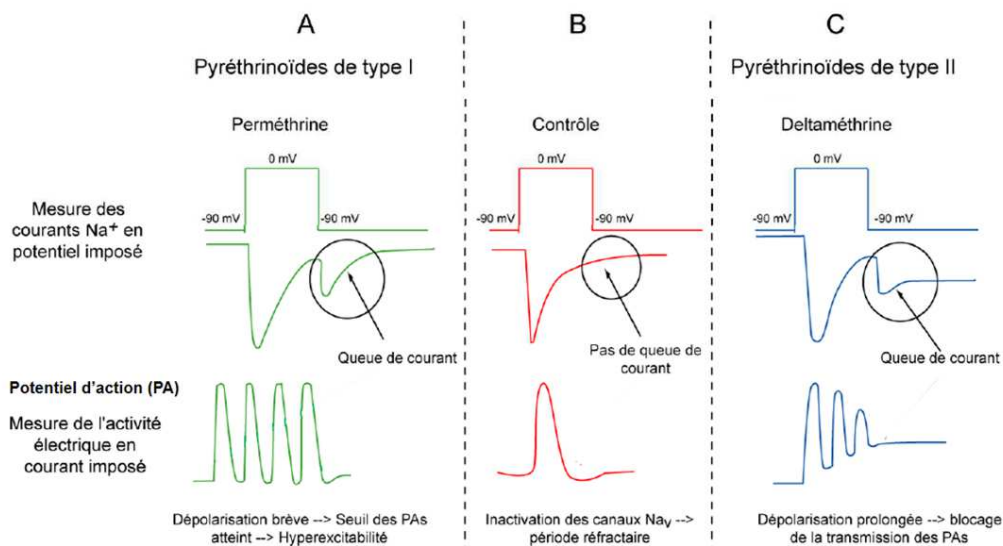


Figure 7: Illustration du mode d'action des pyréthrinoides de type I (A), contrôle (B) et pyréthrinoides de type II (C) (modifié d'après Shafer et al., 2005)

L'hyperexcitation produite par les pyréthrinoides de type I chez les insectes provoque des convulsions, des prostrations et des paralysies typiques qualifiées de « knock-out ». Les pyréthrinoides de type II produisent des effets neurotoxiques beaucoup plus rapidement que les pyréthrinoides de type I. Ces effets se caractérisent par une ataxie, une absence de coordination des mouvements périodiques séparés par des phases de convulsions, une hyperactivité importante accompagnée quelquefois d'une salivation. Il est rapporté de plus, des contractions sporadiques soutenues des pattes. Cette hypersensibilité accompagnée de tremblements conduit à une paralysie de l'insecte, effet « knock-down » (Field et al., 2017; Gammon et al., 1981; Raymond-Delpech et al., 2005; Silver et al., 2014).

2.2.2. Les oxadiazines

2.2.2.1. Structure chimique

Les insecticides appartenant au groupe des oxadiazines ont été découverts au début des années 1970 et ont fait partie de la première génération d'insecticides synthétisés à partir du diflubenzuron, caractérisés par l'inhibition de la synthèse de la chitine chez les

insectes (Mulder et Gijswijt, 1973; Wing *et al.*, 2000). Par la suite, des modifications ont été apportées à leur structure chimique afin de générer de nouveaux composés de type dihydropyrazoles comme le PH 60-41 (Mulder et Gijswijt, 1973) et plus tard le RH-3421, doué d'une activité insecticide plus élevée, à la fois chez l'insecte et chez le mammifère (McCann *et al.*, 2001; Silver *et al.*, 2017) (Figure 8).

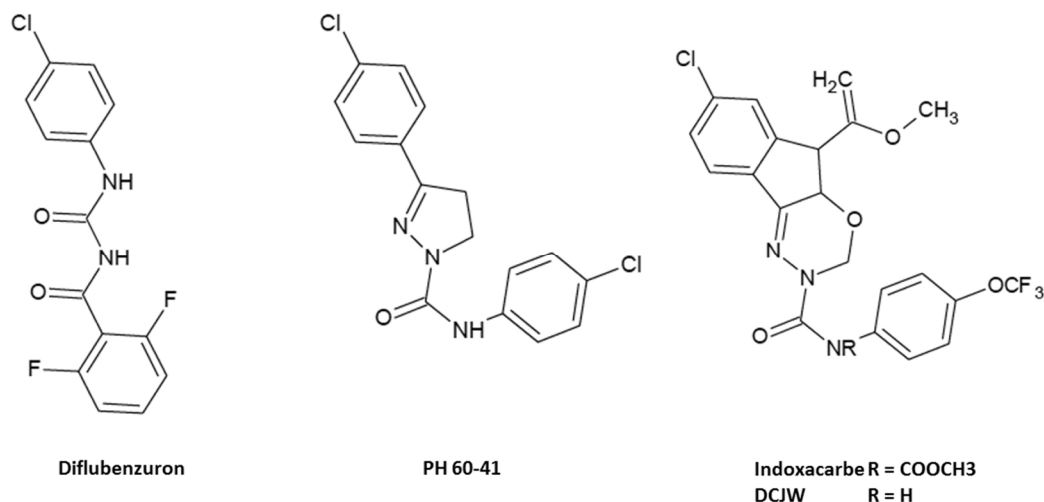


Figure 8: Structures chimiques du diflubenzuron, PH 60-41, de l'indoxacarbe et de son métabolite DCJW (modifié d'après Silver *et al.*, 2017)

Pour contourner ce problème, des études réalisées par les sociétés DuPont et Nihon Nohyaku ont conduit au remplacement du noyau pyrazoline par une série de bioisostères afin de produire des composés avec une forte activité insecticide, une faible toxicité pour les mammifères et une meilleure protection de l'environnement (Wing *et al.*, 2010). Aujourd'hui, l'indoxacarbe et le métaflumizone représentent les deux molécules de référence de la famille des oxadiazines ayant pour effet d'inhiber les canaux sodium dépendant du potentiel. L'indoxacarbe, en particulier, est un pro-insecticide (Casida, 2017), bio-activé en composé N-carbométhoxylé, le DCJW, sous l'action d'estérases et/ou amidases (Wing *et al.*, 2000; 1998) (Figure 9). Le DCJW ainsi produit présente une plus forte activité insecticide chez l'insecte. La capacité de bio-activer l'indoxacarbe en DCJW dépend du mode d'application (intoxication orale ou de contact) et de l'activité métabolique des enzymes de l'insecte (Wing *et al.*, 2000).

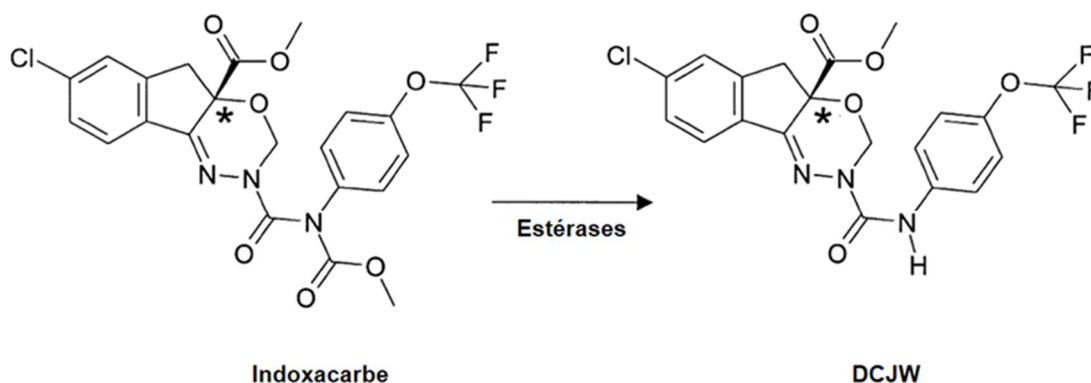


Figure 9: Structure chimique de l'indoxacarbe métabolisé en DCJW (Wing *et al.*, 2000)

2.2.2.2. Mode d'action et symptômes d'intoxication

L'indoxacarbe et le DCJW sont des inhibiteurs des canaux sodium dépendants du potentiel en agissant sur un site différent de ceux décrits pour les pyréthrinoides (Wing *et al.*, 1998 ; Lapied *et al.*, 2001 ; Silver *et al.*, 2017). Le DCJW possède une plus forte affinité pour les canaux sodium dépendants du potentiel comparativement à l'indoxacarbe. Des études réalisées *in vitro* ont montré que l'application de DCJW provoque une diminution de l'amplitude du potentiel d'action (Wing *et al.*, 1998 ; Lapied *et al.*, 2001) (Figure 10). Cet effet est corrélé à une interaction de ce composé sur l'état inactivé du canal sodium dépendant du potentiel (Zhao *et al.*, 2005; Silver *et al.*, 2014, Silver *et al.*, 2017).

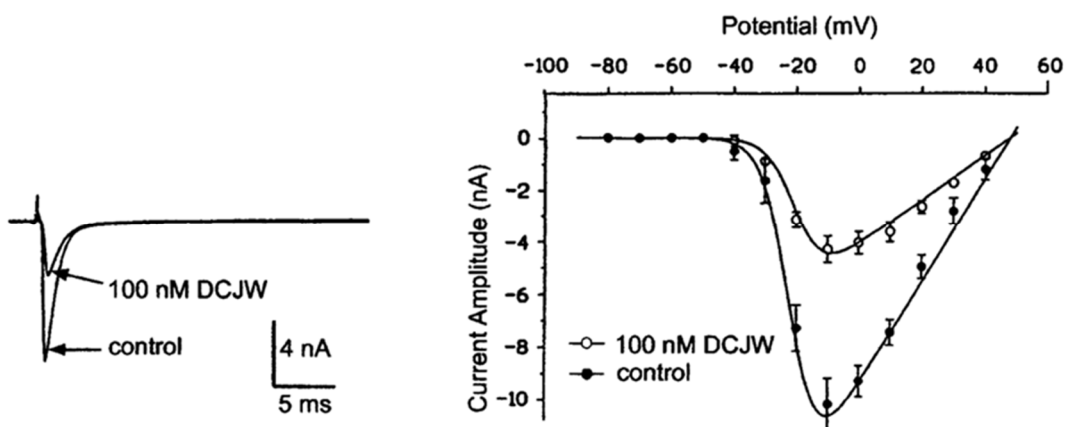


Figure 10: Effet du DCJW sur le courant entrant sodium enregistré sur des cellules neurosecrétrices d'un insecte, la blatte *Periplaneta americana* (modifié d'après Lapied *et al.*, 2001).

Les symptômes neurotoxiques généralement observés chez l'insecte après une intoxication par l'indoxacarbe sont une « pseudoparalyse » ponctuée par des épisodes de mouvements convulsifs, une perturbation de la coordination motrice, une incoordination des mouvements, suivie par la mort de l'insecte (Silver *et al.*, 2017).

3. Mécanismes de résistances aux insecticides

Dans différents pays et en particulier dans les pays en développement, les insecticides sont utilisés de façon non raisonnée, ce qui contribue au développement de résistances des insectes à diverses molécules chimiques (Casida et Durkin, 2013). Ainsi, la baisse significative de l'efficacité des insecticides associée aux développements de résistance qui ne font qu'augmenter au cours des années pose un problème majeur dans le contrôle des insectes ravageurs (Figure 11).

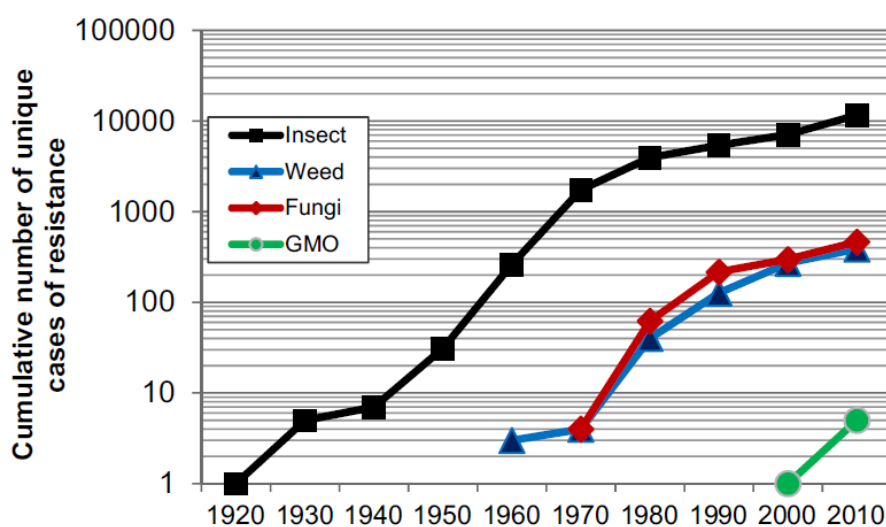


Figure 11: Evolution de la résistance aux insecticides, herbicides et fongicides (Sparks and Nauen, 2015)

La résistance des insectes aux insecticides (Perry *et al.*, 2011) est caractérisée par une combinaison de différents mécanismes physiologiques développés par l'insecte. Elle peut être comportementale, cuticulaire, métabolique et par mutations des cibles (Figure 12).

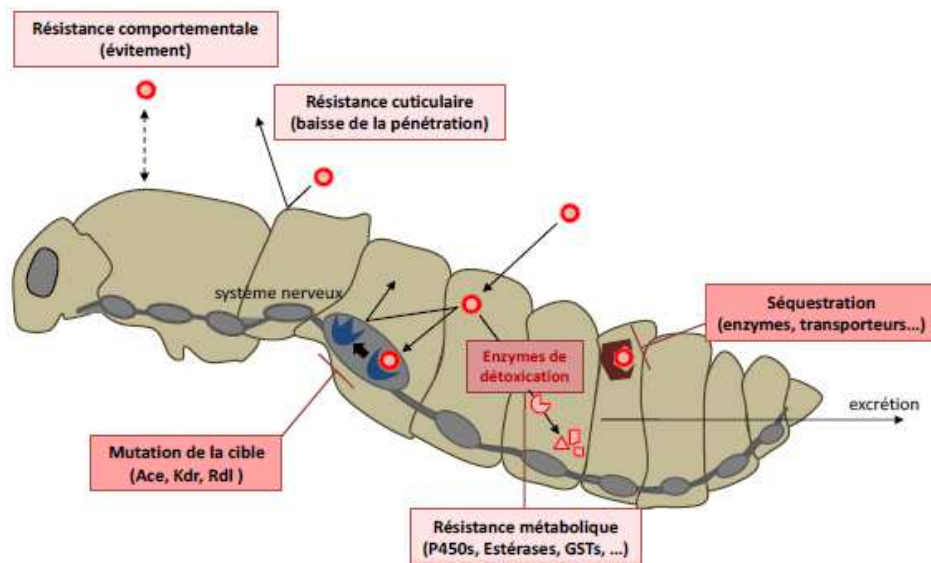


Figure 12: Principaux mécanismes de résistance des insectes aux insecticides (CNEV, 2014)

Selon l'OMS, le terme "résistance" des insectes, correspond à un phénomène d'origine génétique consistant en une diminution de la sensibilité d'une population d'insectes à un insecticide. Selon Whalon (2008), les premiers cas de résistance ont été enregistrés en 1908 avec la cochenille *Aspidiotus perniciosus*, résistante à la chaux sulfureuse (Melander, 1914). Cent ans plus tard, 553 espèces d'arthropodes résistants à au moins un insecticide ont été signalées, dont des moustiques, des poux, des aoûtats, des triatomés et des tiques (Whalon *et al.*, 2008). Après l'introduction des insecticides organiques dans les années 1940 plusieurs cas de résistance ont été détectés. Toutefois, ce phénomène s'est répété avec l'apparition de chaque nouvel insecticide au cours de l'histoire. Avec les insecticides tels que les pyréthrinoides, les organophosphorés et les carbamates, il est fréquent de trouver des cas de résistance chez plusieurs espèces d'insectes (Sparks et Nauen, 2015). Il faut souligner que des cas de résistance croisée ont été identifiés. La résistance croisée est définie comme étant un mécanisme qui confère une résistance à tous les insecticides agissant sur la même cible (e.g., DDT et pyréthrinoides).

3.1. Résistance métabolique

La résistance métabolique est le mécanisme de résistance le plus connu chez les insectes. Il existe plusieurs mécanismes biochimiques responsables de la dégradation des

insecticides. Ils peuvent diminuer leur toxicité, inactiver leur action ou même provoquer leur excrétion. La détoxification est provoquée par l'action des enzymes comme par exemple **les cytochrome-P450 monooxygénases**, les **glutathion-S-transférases** ou bien **les carboxylestérases** ou **estérases** (Sparks et Nauen, 2015). Cette résistance se caractérise par une surexpression de ces enzymes qui dégradent les insecticides par une action sur des liaisons chimiques spécifiques (par exemple les liaisons ester) (Casida et Durkin, 2013; Zhang *et al.*, 2017).

3.2. Résistance par modification de la cible

La résistance par modification de la cible est aussi considérée comme un mécanisme fréquent de résistance développé par les insectes. La plupart des insecticides agit sur une cible bien spécifique (récepteurs ionotropes GABAergiques, cholinergiques de type nicotiniques, canaux sodium dépendants du potentiel et acétylcholinestérases). Par modification de la cible, l'insecticide présente une diminution de son affinité pour le site d'action. Les insectes deviennent alors peu ou pas sensibles à l'insecticide. Cette résistance se caractérise par des mutations ponctuelles silencieuses (mutations *kdr*, *super kdr*, *acer*) (Sparks et Nauen, 2015). Dans ces conditions, la mutation d'un acide aminé confère une diminution de la sensibilité partielle ou totale de la cible pour l'insecticide (Dong, 2007; Dong *et al.*, 2014; Raymond *et al.*, 2017).

Dans le cas des pyréthrinoïdes, l'identification des mutations *kdr* fournit non seulement des marqueurs moléculaires précis permettant d'évaluer rapidement la fréquence des allèles de résistance dans les populations sur le terrain, mais elle s'est également révélée extrêmement utile pour élucider les caractéristiques fonctionnelles des canaux sodium sensibles aux pyréthrinoïdes (Dong *et al.*, 2014) (Figure 13).

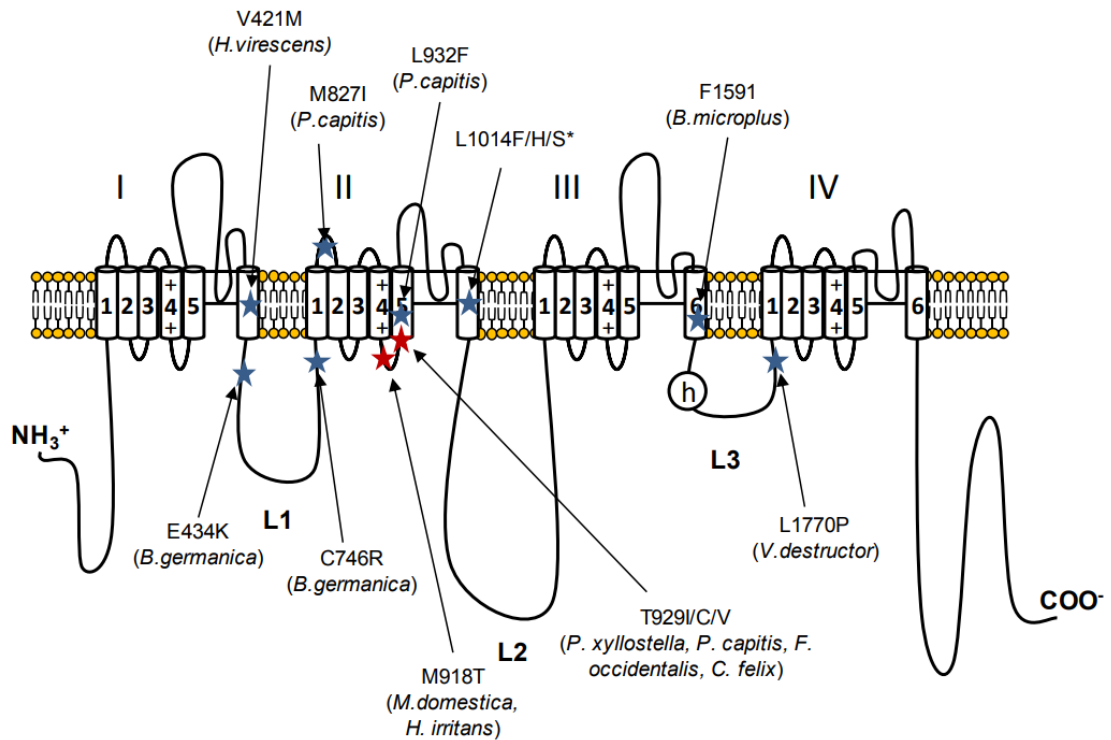


Figure 13: Exemple de mutations *kdr* et *super-kdr* sur la sous-unité α du canal sodium. Les mutations *kdr* sont représentées par des étoiles bleues et les mutations *super-kdr*, par des étoiles rouges (d'après Dong, 2007)

A ce jour, plus de 50 mutations des canaux sodium sont associées à une résistance aux pyréthriinoïdes chez divers arthropodes (Dong *et al.*, 2014; Silver *et al.*, 2014; Casida et Durkin, 2013) (Tableau 2).

Tableau 2: Récapitulatif des mutations *kdr* et *super kdr* chez les insectes ravageurs des cultures

Espèces	Type de mutation	Cible de mutation	Références
<i>Heliothis virescens</i>	<i>kdr</i>	V421M, L1014H, D1549V, E1553G, D3128V, E3132G, L1029H	Chen <i>et al.</i> (2017); Rinkevich <i>et al.</i> (2013)
<i>Haematobia irritans</i>	<i>kdr, super kdr</i>	M918T, L1014F	Barros <i>et al.</i> , (2013)
<i>Myzus persicae</i>	<i>Kdr, super kdr</i>	L1014F, F979S, M918T, M918L	Panini <i>et al.</i> (2015)
<i>Varroa destructor</i>	<i>kdr</i>	L1770P, L925V, L925M, L925I	González-Cabrera <i>et al.</i> (2016)
<i>Plutella xylostella</i>	<i>super-kdr</i>	T929I, L1014F, F1845Y, V1848I	Endersby <i>et al.</i> (2011); Jiang <i>et al.</i> (2015); Wang <i>et al.</i> (2016)
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	<i>kdr</i>	L1014F, T929N	Rinkevich <i>et al.</i> (2012)
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	<i>kdr</i>	T929I, L925I	Kapantaidaki <i>et al.</i> (2018)
<i>Cydia pomonella</i>	<i>kdr</i>	L1014F	Franck <i>et al.</i> (2012)
<i>Sitophilus zeamais</i>	<i>kdr</i>	T929I	Haddi <i>et al.</i> (2018)
<i>Sitophilus oryzae</i>	<i>kdr</i>	L1014F	Haddi <i>et al.</i> (2018)

La résistance à l'indoxacarbe a été étudiée chez certaines espèces de lépidoptères, telle que *P. xylostella*. Deux nouvelles mutations associées à cette résistance, F1845Y et V1848I, dans le domaine IV du segment S6 de la sous-unité α du canal sodium ont été

identifiées chez cet insecte. Ces deux mutations sont à l'origine de la diminution de la sensibilité du canal sodium dépendant du potentiel, en particulier au métabolite actif, le DCJW (Wang *et al.*, 2016). De la même façon, des études *in vitro* réalisées sur ovocytes de *Xenopus* ont montré que la sous-unité α du canal sodium de *Blattella germanica* BgNav₁-1a portant ces deux mutations présente une sensibilité réduite à la fois pour l'indoxacarbe et son métabolite DCJW (Wang *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2015; Silver *et al.*, 2017).

3.3. Résistance comportementale

La résistance comportementale peut être définie comme l'ensemble des modifications du comportement induit par les insecticides sur les insectes. Les insectes résistants peuvent détecter ou reconnaître un danger. Selon Gómez-Guzmán (2017), la résistance comportementale a été décrite chez plusieurs espèces, mais en particulier chez les insectes diptères affectés par les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoides. Les insectes résistants montrent une tendance à fuir vers des zones exemptes d'insecticides.

3.4. Résistance cuticulaire

L'insecte développe une résistance à la pénétration et à l'absorption de l'insecticide par modification de la composition en lipides de la cuticule (Balabanidou *et al.*, 2018). Ainsi, les insectes se protègent vis-à-vis d'une large gamme d'insecticides. La cuticule, également appelée exosquelette, est la partie la plus externe du corps de l'insecte et donc la première à protéger l'insecte de la pénétration de composés externes. Sa structure est composée de différentes couches aux propriétés différentes. La couche la plus externe s'appelle l'épicuticule, principalement composée d'hydrates de carbone, de protéines et de lipides, puis de la pro-cuticule, majeure partie de la masse cuticulaire, principalement composée de fibres de chitine et de protéines. Celle-ci est divisée en exo-cuticule et endo-cuticule. La dernière couche, la plus interne, l'épiderme est composée de cellules qui sécrètent de nombreux composants de base de la cuticule (Figure 14) (Balabanidou *et al.*, 2018).

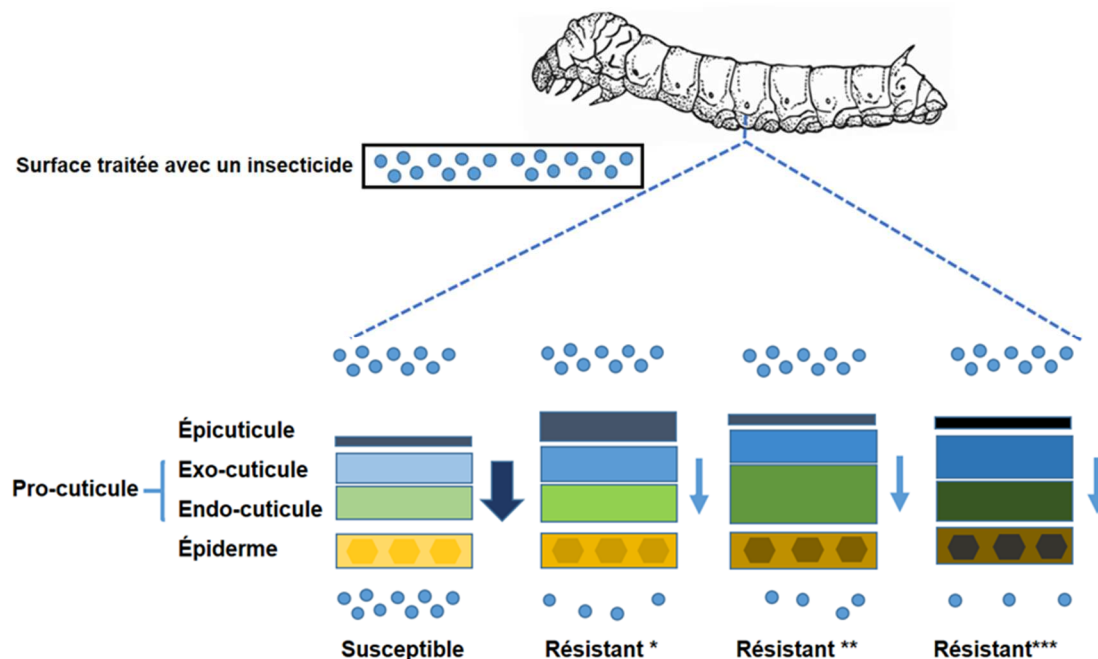


Figure 14: Mécanismes de résistance cuticulaire chez l'insecte. Les modifications cuticulaires proposées pour réduire la pénétration de l'insecticide: Résistant*: épaissement de l'épicuticule, Résistant**: épaissement de la pro-cuticule, Résistant***: composition altérée de la cuticule (modifié d'après Balabanidou *et al.*, 2018)

4. Stratégies alternatives de lutte

Afin de lutter contre les phénomènes de résistance chez les insectes ravageurs des cultures, plusieurs stratégies ont été développées, notamment la rotation d'insecticides et/ou l'utilisation d'associations de substances actives appartenant à des familles chimiques différentes et présentant des modes d'action spécifiques. Parmi ces combinaisons, on peut considérer une association :

- de deux molécules insecticides différentes
- d'un synergiste avec une molécule insecticide
- d'un agent synergisant avec une molécule insecticide.

L'objectif de telles stratégies alternatives est d'obtenir une synergie d'action permettant d'optimiser le traitement tout en réduisant les doses (Apaire-Marchais *et al.*, 2016; Deshayes *et al.*, 2018; Raymond *et al.*, 2017). **Dans le cadre de ce travail de recherche, il ne sera considéré que l'association d'un agent synergisant avec une molécule insecticide.**

4.1. Les agents synergisants

Les agents synergisants sont des composés chimiques ou biologiques utilisés pour augmenter la sensibilité des cibles aux insecticides afin de diminuer les concentrations de produits utilisés (Deshayes *et al.*, 2018). Les agents synergisants se différencient donc des synergistes utilisés classiquement dans les formulations. En effet, les synergistes sont des produits chimiques qui augmentent l'efficacité d'un insecticide en inhibant les enzymes de détoxification impliquées dans la dégradation de l'insecticide. Les deux synergistes les plus couramment utilisés sont le piperonyl butoxide (PBO) et le S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). Le PBO est associé aux pyréthrinoides dans les formulations pour inhiber l'effet des cytochrome-P450 monooxygénases qui interviennent dans la dégradation de ces insecticides (Sarwar, 2016).

Les agents synergisants utilisés à des concentrations non toxiques sont capables d'activer des voies de signalisation intracellulaires dépendantes du calcium impliquées dans l'augmentation de la sensibilité des cibles aux insecticides (récepteurs membranaires et canaux ioniques). Ainsi chez l'insecte, l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire induite par un agent synergisant produit des changements de conformation de la cible membranaire, directement ou indirectement par des processus de phosphorylation ou de déphosphorylation. Ces changements de conformation conduisent à une augmentation de la sensibilité des cibles aux insecticides, ce qui permet de réduire les concentrations d'insecticides utilisés (Apaire-Marchais *et al.*, 2016; Lapied *et al.*, 2009; Deshayes *et al.*, 2018). Parmi les agents synergisants chimiques et biologiques utilisés aujourd'hui, les répulsifs (e.g. DEET et IR3535) et les virus d'insectes (baculovirus et densovirus) présentent toutes les caractéristiques requises d'agents synergisants. Des études précédentes ont montré que l'utilisation d'un répulsif, le DEET, à faible concentration (subrépulsive) est capable d'augmenter la sensibilité des acétylcholinestérases membranaires au carbamate (propoxur) *via* l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire dépendante du calcium (Abd-Ella *et al.*, 2015). Dans le même contexte, un autre répulsif, l'IR3535, est utilisé pour optimiser l'efficacité des néonicotinoïdes (thiaclopride et thiaméthoxame), agonistes des récepteurs cholinergiques de type nicotiques chez l'insecte *via* l'augmentation de calcium intracellulaire (Goulu *et al.*, 2017a et 2017b). Des virus insectes comme par exemple les baculovirus et les densovirus peuvent également être utilisés comme des agents synergisants puisqu'il a été montré que l'augmentation de calcium intracellulaire induite par ces virus potentialise l'effet d'un

organophosphoré, le chlorpyrifos éthyl (Licznar *et al.*, 2014; Apaire-Marchais *et al.*, 2016) (Figure 15).

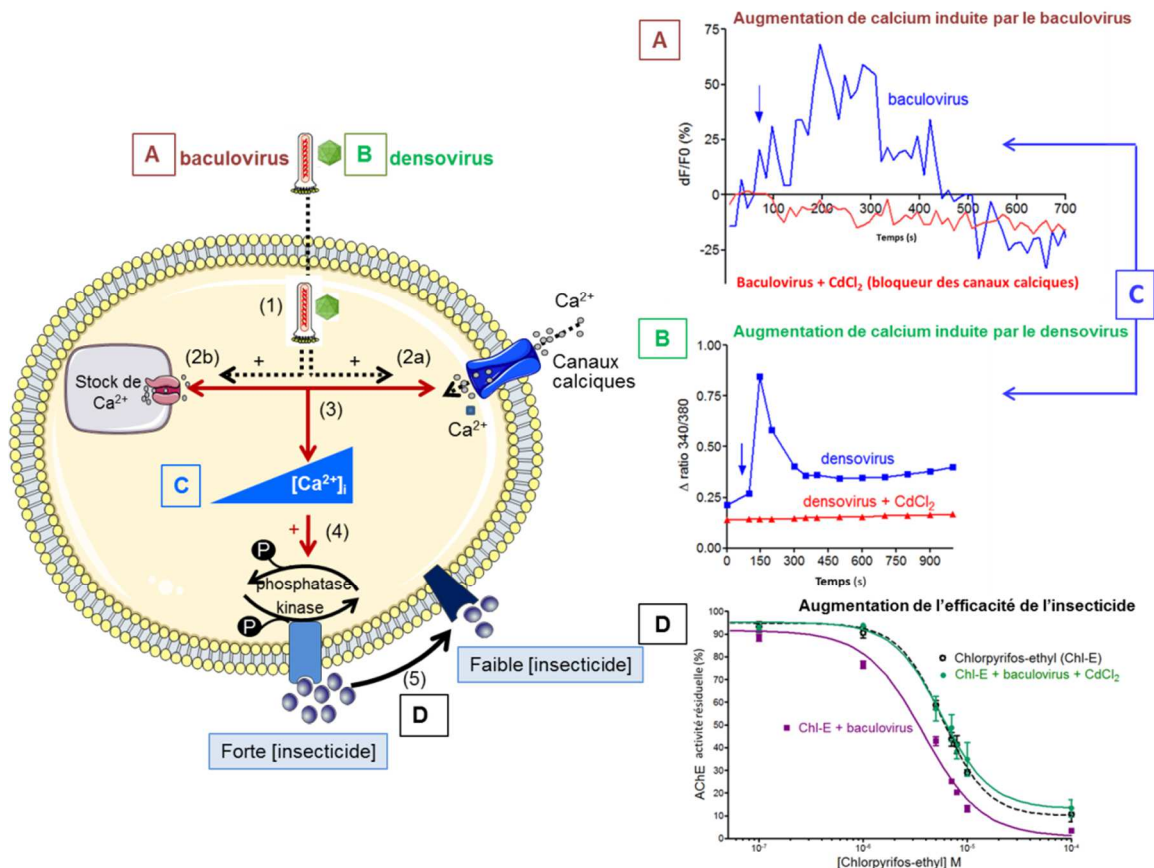


Figure 15: Représentation schématique de l'entrée du baculovirus (A) et du densovirus (B) dans une cellule d'insecte (illustration à gauche) corrélée à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) (A,B). La première étape de l'infection virale commence par l'entrée du virus dans la cellule de l'insecte par la fusion des membranes cellulaires et virales ou par endocytose clathrine-dépendante, permettant la distribution du virus dans le cytoplasme (1). L'entrée du virus dans la cellule induit une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (A, B et C) via un influx de calcium par activation des canaux calciques de la membrane plasmique (2a) ou par libération du calcium des stocks intracellulaires (2b), provoquant l'activation du processus de phosphorylation/déphosphorylation calcium-dépendant (4). Il en résulte un changement de conformation de la cible (5) la rendant plus sensible à un insecticide donné (D). (D'après Licznar *et al.*, 2014 et Apaire-Marchais *et al.*, 2016).

4.2. Mécanismes intracellulaires impliqués dans l'augmentation de la sensibilité des cibles membranaires aux insecticides

L'utilisation d'agents synergisants repose sur leur capacité d'augmenter la concentration en calcium intracellulaire impliquée dans l'activation des voies de signalisation intracellulaires dépendantes du calcium. Les cibles membranaires sensibles aux insecticides chez l'insecte sont connues pour être régulées par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation qui sont responsables des changements de conformation du récepteur et du canal ionique. Cet effet a pour conséquences de modifier la sensibilité de ces cibles aux insecticides (Figure 16). Des études électropharmacologiques, de docking moléculaire, d'imagerie calcique ont démontré que les canaux sodium dépendants du potentiel, les récepteurs GABAergiques ionotropes et récepteurs cholinergiques de type nicotinique, les enzymes comme l'acétylcholinestérase deviennent plus sensibles aux insecticides (oxadiazine, phénylpyrazole, néonicotinoïdes, carbamates) lorsque la concentration en calcium intracellulaire est augmentée et que des voies de signalisation spécifiques (PKA, PKC, PKG, CaMkinase II, PP1-2A, calcineurine) sont activées (Thany *et al.*, 2007 ; Lavalie-Defaix *et al.*, 2010; Murillo *et al.*, 2011; Calas-List *et al.*, 2013; Bodereau-Dubois *et al.*, 2012; Mannai *et al.*, 2016; Abd-Ella *et al.*, 2015).

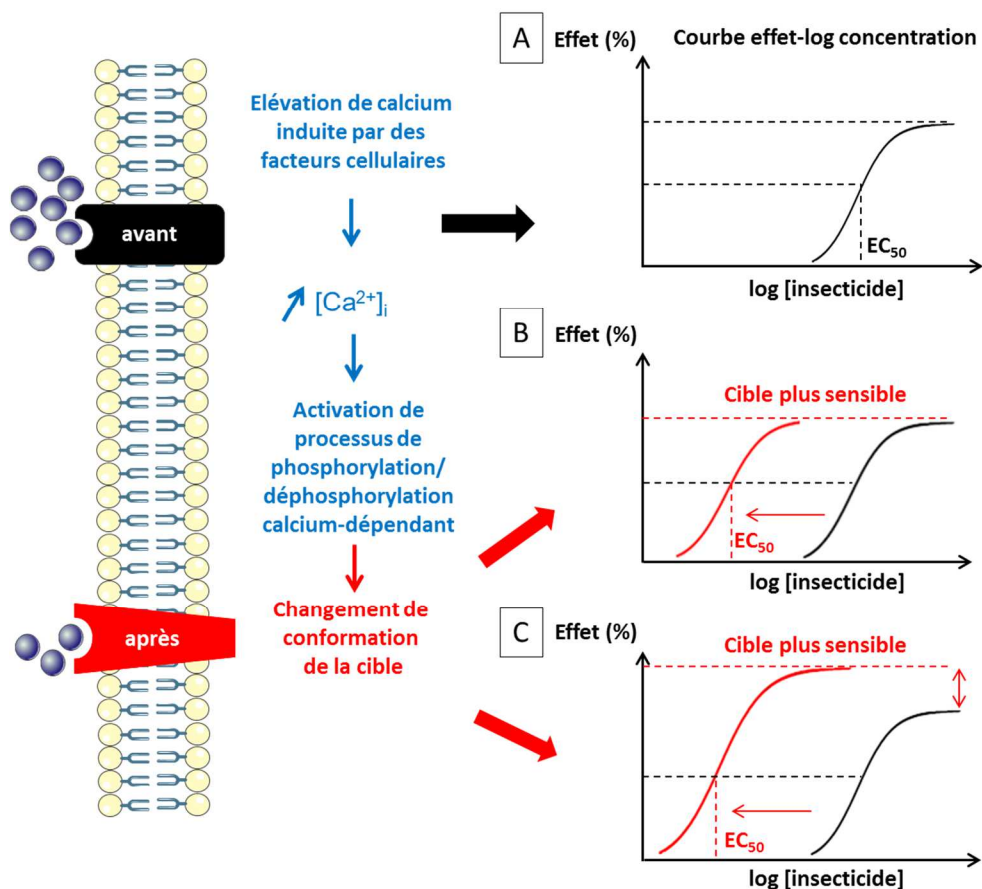


Figure 16: Schéma résumant les processus de phosphorylation/déphosphorylation calcium-dépendants sur l'augmentation de l'efficacité d'un insecticide par changement de conformation de la cible. Les effets d'un insecticide donné (%) sont représentés par rapport aux logarithmes des concentrations croissantes d'insecticides, avant (A) et après le processus de phosphorylation/déphosphorylation calcium-dépendant (B, C). Les EC_{50} sont calculées à partir des courbes sigmoïdes correspondantes. Le processus de phosphorylation/déphosphorylation rend la cible membranaire plus sensible à un insecticide donné et la courbe effet log-concentration permet d'obtenir un EC_{50} plus faible, résultant d'un déplacement de la courbe sigmoïde vers des concentrations plus faibles (B). Cet effet peut être aussi associé à une augmentation de l'efficacité maximum de l'insecticide (C).

5. Objectif du travail de thèse

Dans un contexte de développement de stratégies alternatives, l'objectif de ce travail réside dans l'utilisation de la deltaméthrine, insecticide de type pyréthroïde, comme agent synergisant. Dans ces conditions, la deltaméthrine, **à faible concentration, n'est pas utilisée comme un insecticide mais comme une molécule capable de potentialiser l'effet d'un insecticide (indoxacarbe) associé via l'augmentation de calcium intracellulaire.** Par conséquent, nous avons étudié l'effet synergique *in vivo* de l'association de ces deux composés sur la blatte *Periplaneta americana*. L'originalité de la formulation proposée repose sur l'utilisation de la deltaméthrine nanoencapsulée associée à l'indoxacarbe. Le but est d'obtenir une meilleure efficacité du traitement tout en réduisant des doses utilisées comparée à l'efficacité des formulations disponibles aujourd'hui qui sont composées d'un synergiste (e.g. PBO) associé à un insecticide.

Partie 2 : Mise en évidence *in vivo* de l'effet synergisant de la deltaméthrine pour potentialiser l'effet de l'indoxacarbe.

1. Contexte et position du problème

Dans le contexte de ce travail de recherche, l'effet synergique de la deltaméthrine (pyréthrianoïde de type II) avec le métabolite actif DCJW de l'indoxacarbe a été montré *in vitro* au laboratoire SiFCIR sur DUM neurones de blattes *Periplaneta americana*. Cette étude indique que la deltaméthrine *via* un mécanisme dépendant du calcium intracellulaire original permet de rendre le canal sodium dépendant du potentiel beaucoup plus sensible à de faibles concentrations de DCJW. En effet, l'influx de sodium généré par l'action de la deltaméthrine provoque une inversion de l'échange Na/Ca (Annunziato *et al.*, 2004) qui est responsable de l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire à l'origine de l'augmentation de la sensibilité des canaux sodium (Figure 17). En effet, il a été montré précédemment sur la même préparation que les canaux sodium dépendant du potentiel sont beaucoup plus sensibles au DCJW en présence d'une élévation de calcium intracellulaire (Lavialle-Defaix *et al.*, 2010). Cette première partie est présentée dans la publication jointe en annexe (Annexe 2).

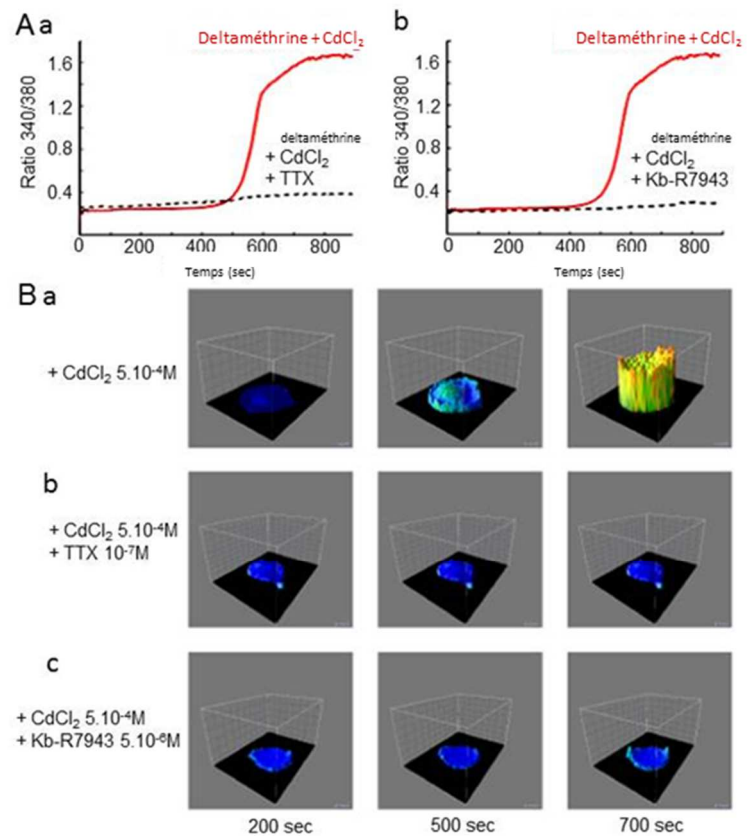


Figure 17: Effet de la deltaméthrine ($10^{-6}M$) sur la variation de la concentration en calcium intracellulaire provoquée par l'inversion de l'échange Na/Ca. $CdCl_2$: chlorure de cadmium (bloqueur des canaux calciques) ; TTX : Tétrodoxtine (inhibiteur des canaux sodium dépendants du potentiel) ; Kb-R7943 (inhibiteur de l'échange Na/Ca mode inverse).

Cette combinaison qui a fait l'objet d'un brevet (Flochlay-Sigognault *et al.*, 2014) a permis de montrer que la deltaméthrine utilisée à faible concentration comme agent synergisant potentialise l'effet insecticide du DCJW sur des canaux sodium exprimés par les neurones d'insecte (Figure 18).

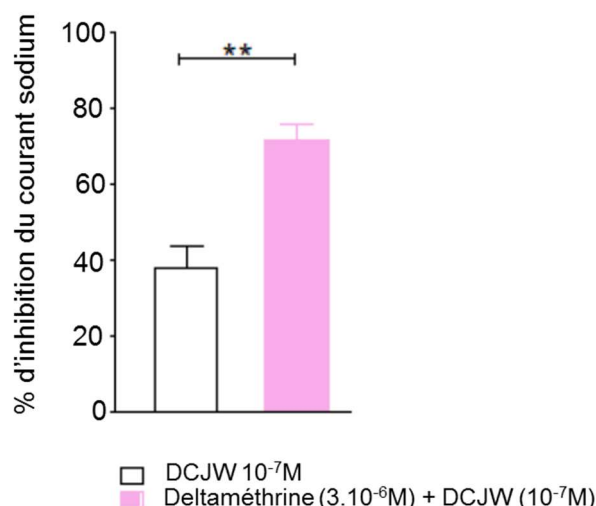


Figure 18: Effet de l'association deltaméthrine avec le DCJW sur l'amplitude du courant entrant sodium sur neurone de blatte *Periplaneta americana*. Les données sont des valeurs moyennes \pm S.E.M. Analyse statistique ANOVA suivie d'un test Bonferroni (** $p < 0,01$, $n=6$).

En se basant sur les résultats présentés ci-dessus et ceux illustrés dans la publication présentée en annexe 2, il devenait intéressant d'évaluer si un tel effet synergique était observé sur *Periplaneta americana in vivo*.

2. Matériels et méthodes

2.1. Modèle biologique : *Periplaneta americana*

Une grande partie des travaux réalisés au sein du laboratoire SiFCIR s'appuie sur l'étude du système nerveux central de la blatte : *Periplaneta americana*. La blatte est un insecte relativement ancien, qui fait partie de la famille des *Blattidae*, l'une des espèces d'insectes les plus nombreuses. Ce modèle biologique est intéressant et très utile pour étudier l'effet de molécules neurotoxiques, décrire les modes d'action, ainsi que les mécanismes de différents insecticides agissant au niveau du système nerveux central des insectes (Stankiewicz *et al.*, 2012). L'utilisation de la blatte comme modèle de laboratoire permet d'extrapoler ensuite les résultats sur d'autres organismes nuisibles, principalement sur les insectes ravageurs de cultures.

Les études toxicologiques *in vivo* ont été réalisées sur des blattes mâles adultes *Periplaneta americana* pour différentes raisons : chez les mâles le SNC est moins recouvert de tissus adipeux que les femelles, et la plupart des connaissances anatomiques

et fonctionnelles proviennent d'expériences réalisées sur les blattes mâles adultes (Stankiewicz *et al.*, 2012).

Les blattes proviennent de l'élevage du laboratoire SiFCIR, n'ont jamais été en contact avec des insecticides, et sont élevées dans des vivariums sous conditions de température et lumière contrôlées : une température constante de 29°C et une photopériode de 12h de lumière et 12h d'obscurité. La distinction entre les deux sexes s'observe aisément au stade adulte. En effet, les mâles et les femelles possèdent deux cerques, mais les mâles ont deux appendices à l'extrémité de l'abdomen, que ne possèdent pas les femelles (Figure 19).

Les procédures de soin, d'alimentation et de manipulation des animaux étaient conformes aux directives sanitaires institutionnelles et nationales françaises.

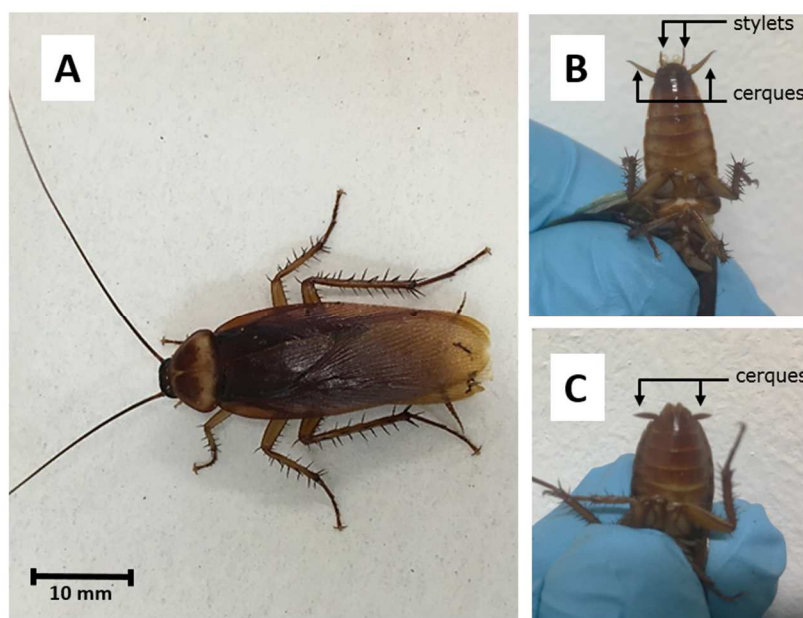


Figure 19: Blatte *Periplaneta americana* en vue dorsale. A: mâle adulte, B: mâle, C: femelle.

2.2. Etudes *in vivo* : exposition aux insecticides

2.2.1. Insecticides et produits pharmacologiques utilisés

La deltaméthrine utilisée pour toutes les expérimentations provient de chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). La solution mère de deltaméthrine (DLT) a été préparée dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich) à 10^{-2} M et stockée à -20°C . Des dilutions ultérieures de deltaméthrine (10^{-3} M à 10^{-7} M) ont été préparées dans du sirop de sucrose (Sigma-Aldrich) à 100 mg mL^{-1} . Pour ces études toxicologiques *in vivo*, la plus forte concentration de DMSO utilisée pour les expériences de toxicité était de 0.1% (v/v). A cette concentration, il n'a pas été observé du DMSO sur la mortalité des blattes.

L'indoxacarbe (Avaunt® émulsion concentrée à 15% (EC)) a été fourni par DuPont™ et dilué (1/28) dans du sirop de sucrose à 100 mg mL^{-1} pour obtenir une solution-mère à 10^{-2} M. Des dilutions d'indoxacarbe (10^{-3} M à 10^{-7} M) ont été préparées dans du sirop de sucrose à 100 mg mL^{-1} pour les expériences *in vivo*.

Le piperonyl butoxide (PBO) (Sigma-Aldrich), qui est un inhibiteur de cytochrome-P450 monooxygénases, a été préparé dans DMSO pour obtenir une solution mère à $500\text{ }\mu\text{g/mL}$.

2.2.2. Protocole d'intoxication des blattes

Des études toxicologiques *in vivo* ont été réalisées sur des lots de 10 blattes adultes par concentration d'insecticide. Entre 6 et 10 lots ont été exposés à chaque concentration d'insecticide testé. Avant de commencer les expérimentations, les blattes ont été privées d'eau 48h pour s'assurer que chaque blatte ingère l'intégralité de la dose. Les différentes concentrations d'insecticides ont été administrées par voie orale.

Les insecticides ont été dilués dans une solution de sucrose (100 mg mL^{-1}) par dilutions en cascade afin d'obtenir les gammes de concentrations désirées pour la deltaméthrine, l'indoxacarbe et pour la deltaméthrine nanoencapsulée (LNC-DLT) (Figure 20).

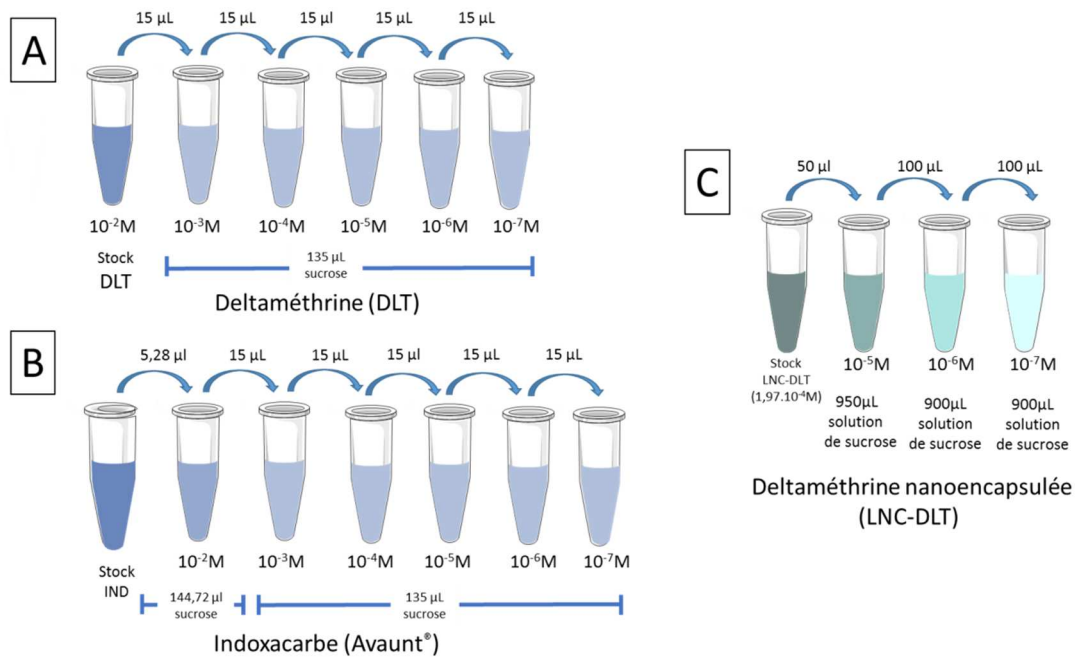


Figure 20: Dilutions en cascade réalisées pour la préparation des solutions de deltaméthrine (DLT) (A) d'indoxacarbe (IND)(B) et de deltaméthrine nanoencapsulée (LNC-DLT)(C).

Dix microlitres d'insecticide ou 10 μL d'agent synergisant puis 10 μL d'insecticide, ont été déposés sur du parafilm M® (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). L'administration de la dose par voie orale a été réalisée manuellement pour chaque blatte afin qu'elles absorbent la totalité de la ou des solution(s) (Figure 21).

Les expériences de contrôle ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales avec une solution de sucrose (100 mg mL^{-1}) (sans insecticide) et additionnée de DMSO aux concentrations utilisées pour les expériences réalisées avec la deltaméthrine à 24h, 48h et 72h. En parallèle, des expériences ont été effectuées avec le PBO, ajouté à la deltaméthrine seule ou à la deltaméthrine associée avec l'indoxacarbe. Le PBO a été utilisé à une dose subléthale de 50 μg /blatte (Benzidane Y., communication personnelle). Pour réaliser ces manipulations, le PBO a été dilué au préalable dans une solution de sucrose au 1/100.



Figure 21: Protocole d'intoxication des blattes

Après l'ingestion de l'insecticide ou de l'association (agent synergisant et insecticide), les blattes ont été replacées dans leur vivarium. Elles disposent de nourriture et l'eau est ajoutée seulement 2 heures après l'intoxication pour éviter une dilution de la concentration des substances actives testées chez la blatte.

Le taux de mortalité a été évalué 24h, 48h, 72h et 96h après le traitement. Les critères de mortalité sont basés sur l'observation quotidienne de l'aspect et du comportement des blattes (Figure 22).

Les symptômes d'une intoxication des blattes par l'insecticide sont les suivants :

1. Les blattes se retrouvent sur le dos.
2. Les pattes et les antennes sont complètement contractées.
3. Aucun mouvement dans les extrémités des pattes n'est observé.
4. La mort de la blatte est constatée en appuyant sur son abdomen pendant 1 minute et lorsqu' aucun mouvement de ses extrémités n'est observé.

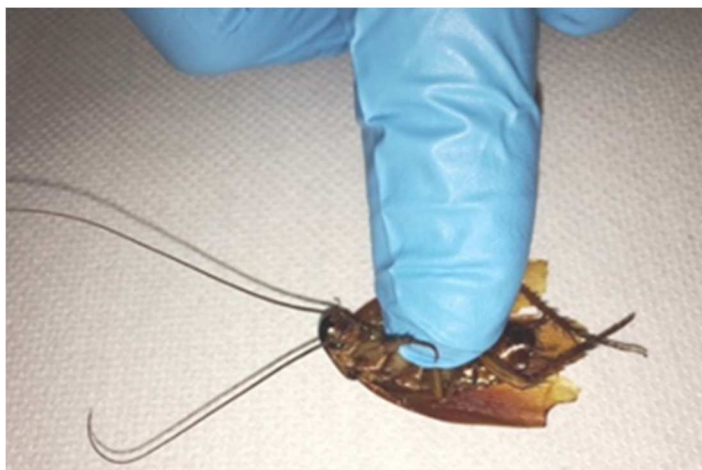


Figure 22: La mort de la blatte est estimée par pression sur l'abdomen.

2.2.3. Analyse des données

Les courbes de mortalité et les tests statistiques non paramétriques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism v5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) pour comparer les valeurs de mortalités entre les différents traitements pour chaque concentration. Les concentrations efficaces nécessaires pour obtenir 50% de l'effet maximum (CE_{50}) ont été déterminées. L'équation de Hill utilisée pour ajuster la courbe sigmoïde était :

$$(1) \quad Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(LogEC_{50} - X) \cdot HillSlope}}$$

Top et *Bottom* sont les valeurs minimum et maximum indiquées sur la courbe, CE_{50} est la concentration efficace qui produit 50% de l'effet maximum. *HillSlope* décrit la pente de la courbe. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées avec le test de Mann-Whitney (test non paramétrique) en utilisant la version 5.0 de GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Les résultats ont été considérés comme significatifs pour $p < 0,05$.

L'indice de combinaison (IC) (Chou et Talalay, 1984) a été utilisé pour évaluer l'interaction synergique possible entre deltaméthrine/indoxacarbe. Pour évaluer les synergies, l'antagonisme et/ou l'effet additif, l'indice de combinaison a été déterminé en utilisant l'équation suivante :

$$(2) \quad ICx = \frac{LCx^{1m}}{LCx^1} + \frac{LCx^{2m}}{LCx^2} + \left(\frac{LCx^{1m}}{LCx^1} \times \frac{LCx^{2m}}{LCx^2} \right)$$

les valeurs LCx^{1m} et LCx^{2m} sont les concentrations létales (LC) des insecticides 1 et 2 dans le mélange, respectivement, donnant x mortalité. LCx^1 et LCx^2 sont les concentrations létales des insecticides 1 et 2 respectivement, produisant la même mortalité x quand ils sont utilisés seuls. Les valeurs résultantes de l'IC ont été catégorisées pour classer l'effet du mélange : effet additif lorsque l'IC = 1, effet antagoniste lorsque l'IC > 1 et effet synergique lorsque l'IC < 1. Ces valeurs ont été calculées pour une mortalité de 20%.

3. Résultats

3.1. Détermination de la concentration la plus faible de deltaméthrine utilisée comme agent synergisant

Nous avons d'abord examiné l'effet de la deltaméthrine sur des blattes *Periplaneta americana* adultes mâles. Afin de déterminer la concentration la plus forte de deltaméthrine qui ne produit pas de mortalité à 24h, 48h et 72h, des courbes effets log-concentration ont été établies dans chaque condition. Les courbes sigmoïdes obtenues grâce à l'utilisation de l'équation de Hill (1) ont permis de déterminer les CE_{50} pour la deltaméthrine à 24h, 48h et 72h (tableau 3).

Tableau 3: Caractéristiques des courbes dose-réponse obtenues avec la deltaméthrine après intoxication des blattes *Periplaneta americana*

	24h	48h	72h
CE_{50} (M)	$2,35 \cdot 10^{-5}$	$2,31 \cdot 10^{-5}$	$2,26 \cdot 10^{-5}$
Pente	5,40	6,09	3,50
R^2	0,85	0,94	0,97

La concentration seuil est de 10^{-5} M à 24h, 48h et 72h (Figure 23). L'effet maximum mesuré est de $58 \pm 12\%$ à 24 heures (n = 17) à $91 \pm 7\%$ (n = 18) et 98 ± 3 (n = 11) à 48 et 72 heures, respectivement (Figure 23).

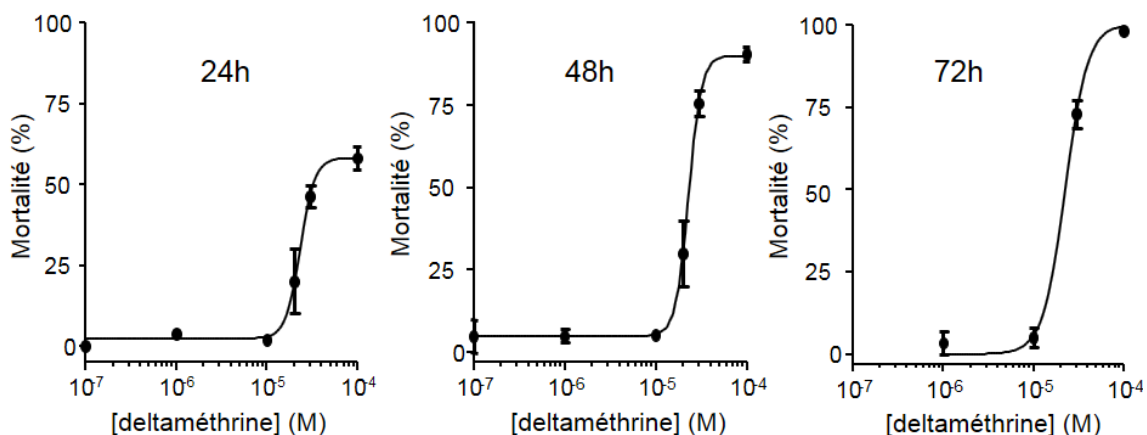


Figure 23: Courbes effet log-concentration obtenues avec la deltaméthrine après intoxication des blattes *Periplaneta americana* à 24h, 48h et 72h.

3.2. Effet synergique de l'association de la deltaméthrine avec l'indoxacarbe

A partir des résultats (i) illustrés dans la figure 17 qui montrent que la deltaméthrine utilisée à 10^{-6} M augmente significativement la concentration en calcium intracellulaire sur neurones isolés et (ii) ceux obtenus ci-dessus, les concentrations de deltaméthrine à utiliser, 10^{-6} M et 10^{-5} M, ont été choisies pour être testées en association avec l'indoxacarbe dans une gamme de concentrations de 10^{-7} M à 10^{-5} M (Figure 24).

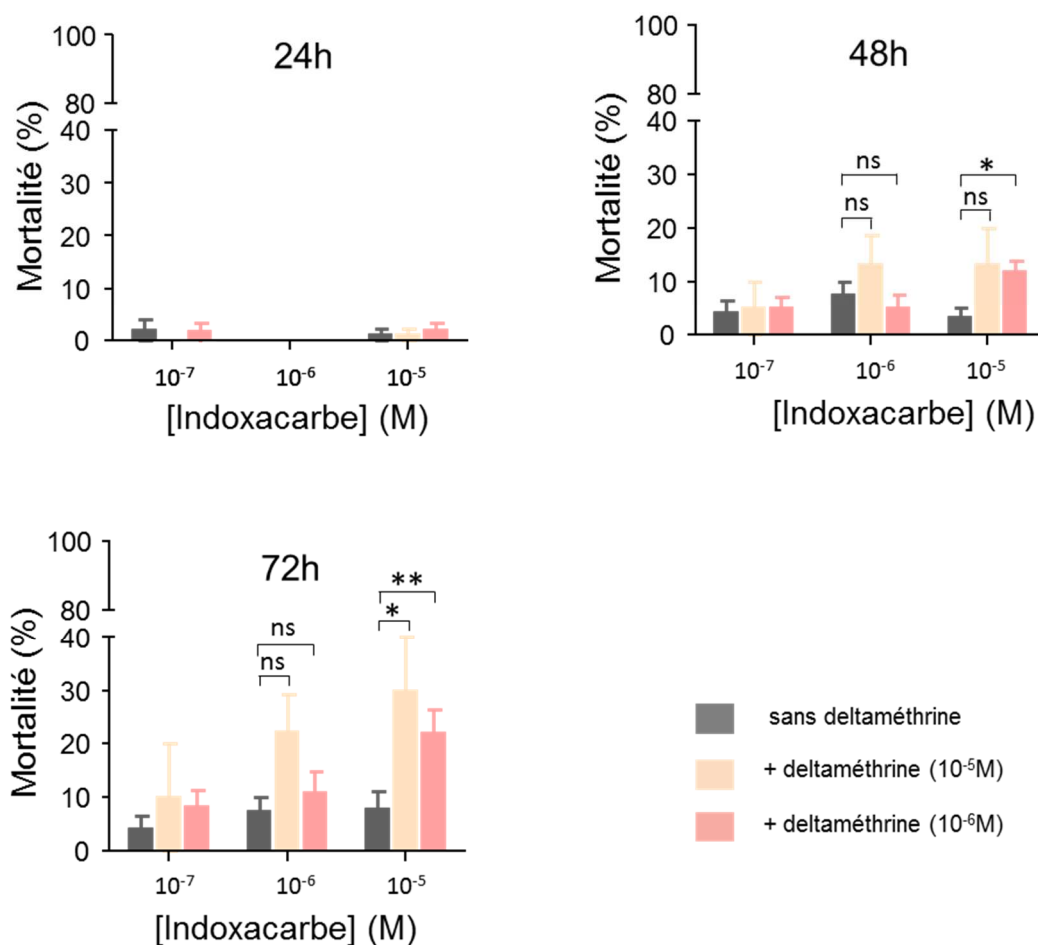


Figure 24: Histogrammes comparatifs illustrant l'effet de l'indoxacarbe seul, et associé à la deltaméthrine utilisée à 10⁻⁵M et 10⁻⁶M. Les données sont des valeurs moyennes ± S.E.M. ns (non significatif) p>0.05; *p<0,05; **p<0.01, (n=4 à 9).

L'effet le plus significatif sur le pourcentage de mortalité des blattes *Periplaneta americana* est obtenu en utilisant la concentration la plus faible de deltaméthrine à 10⁻⁶M et d'indoxacarbe à 10⁻⁵M à 72h (p<0,01) (Figure 24).

Il est connu dans la littérature que la deltaméthrine est dégradée par des cytochromes P450-monoxygénases en métabolites. Par conséquent, des expériences supplémentaires ont été réalisées en présence du synergiste, le piperonyl butoxide (PBO), inhibiteur de ces enzymes de détoxication. Comme illustré dans la figure 25, l'addition de PBO à la deltaméthrine 10⁻⁵M augmente le pourcentage de mortalité pour toutes les durées d'exposition (24, 48 et 72h).

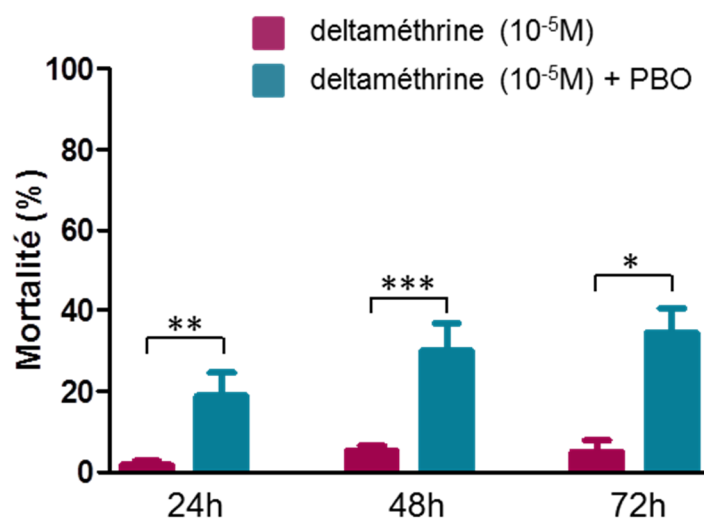


Figure 25: Histogrammes comparatifs représentant le pourcentage de mortalité des blattes obtenu avec de la deltaméthrine 10⁻⁵M seule et additionnée d'une dose subléthale de PBO (50µg/blatte). Les données sont des valeurs moyennes ± S.E.M. (n= 6-9). ns (non significatif) p>0.05; *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

4. Conclusion

Ces premiers résultats permettent de confirmer l'effet synergique de l'association deltaméthrine / indoxacarbe sur insecte *in vivo*, précédemment décrit sur préparation neuronale du même insecte *in vitro*. De plus la concentration seuil de deltaméthrine à utiliser dans l'association a pu être estimée à 10⁻⁶M.

Compte tenu du principal objectif de la thèse concernant l'optimisation du traitement insecticide et suite aux résultats obtenus avec le PBO, une stratégie de nanoencapsulation de la deltaméthrine, utilisée comme agent synergisant, a été développée.

Partie 3 : Nanoencapsulation de la deltaméthrine

1. Contexte et position du problème

En agriculture, les produits phytosanitaires, malgré leur toxicité, restent toujours à l'heure actuelle le meilleur moyen de lutte contre les insectes ravageurs des cultures. Néanmoins, les insecticides et la manière dont ils sont utilisés ont une efficacité limitée en raison d'un certain nombre de problèmes qui leurs sont associés. Il est estimé que plus de 90% des insecticides appliqués sont soit disséminés dans l'environnement, soit dégradés, et donc incapables d'atteindre la zone cible requise pour une lutte efficace (Nuruzzaman *et al.*, 2016). Plusieurs facteurs, dont les techniques d'épandage, les propriétés physicochimiques des insecticides et les conditions environnementales : vent, humidité, température, etc., entraînant lessivage, évaporation, dégradation par photolyse et hydrolyse, ont une incidence sur l'efficacité du traitement (Bedos *et al.*, 2002; van den Berg *et al.*, 1999). Les principales voies de disséminations et de dégradations des insecticides sont illustrées dans la figure 26, et par conséquent la concentration en insecticide dans la zone cible est bien souvent inférieure à la concentration minimale efficace.

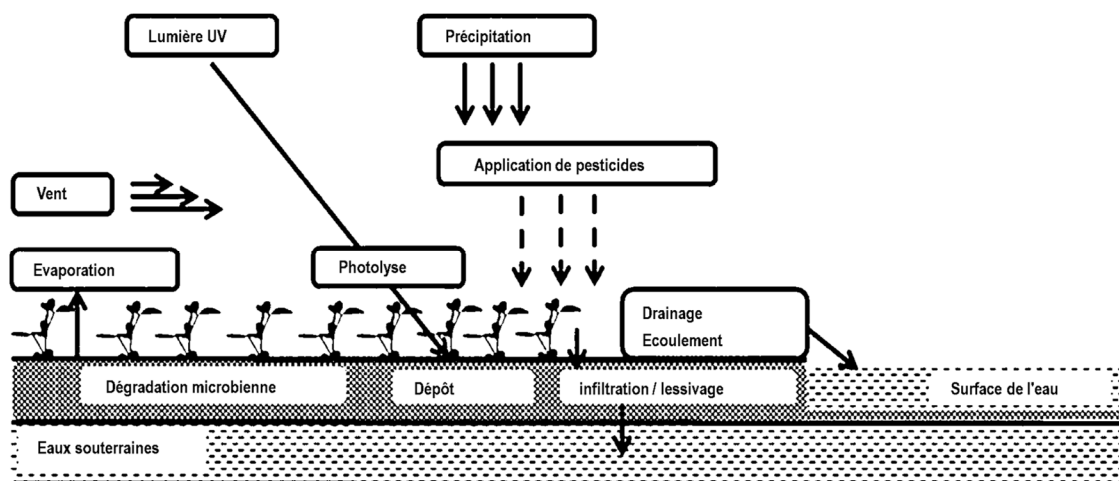


Figure 26: Voies de disséminations et de dégradations des insecticides

(Nuruzzaman *et al.*, 2016)

Une utilisation non raisonnée des insecticides a entraîné d'une part le développement de résistance des insectes cibles, mais aussi d'autre part une destruction des espèces non cibles : destruction des prédateurs et pollinisateurs, ce qui affecte la chaîne alimentaire par modification de la biodiversité (réduction de sources de nourriture des oiseaux par exemple) (Tilman *et al.*, 2002). Chez l'homme, les effets néfastes sur la santé associés aux insecticides chimiques peuvent être dermatologiques, gastro-intestinaux, neurologiques, cancérigènes, respiratoires, reproductifs ou endocriniens (Mostafalou et Abdollahi, 2017). Malgré tout, leur utilisation est essentielle pour optimiser la production des quantités agricoles et une meilleure connaissance des effets secondaires induits par les insecticides sur la santé publique et les espèces non-cibles a conduit à un contrôle de plus en plus strict de leur utilisation par différents organismes réglementaires (Copping, 2009). Il est aujourd'hui crucial de trouver de nouvelles stratégies afin i) d'optimiser le contrôle des populations d'insectes ravageurs des cultures, ii) de diminuer l'émergence de nouvelles résistances et iii) de réduire l'impact sur les organismes non-cibles et sur l'environnement.

1.1. Les nanoparticules en agriculture

- Nanoparticules pour améliorer la qualité du sol

L'augmentation de la rétention d'eau dans les sols peut se faire en utilisant des hydrogels, les nanoargiles et les nanozéolites. Ainsi, les périodes de pénurie hydrique pendant la saison des cultures sont réduites avec une libération lente d'eau à partir de ces nanosystèmes (Sekhon, 2014). Des nanoparticules inorganiques ou polymère et des nanotubes de carbones ont aussi été utilisés pour absorber les contaminants de l'environnement, améliorant la capacité de traitement des sols avec une réduction des temps et coûts de traitement (Khin *et al.*, 2012).

- Nanoparticules comme agents stimulant la croissance des plantes

L'absorption des nutriments par la plante peut être renforcée par l'utilisation de nanoparticules d'Au, SiO₂, ZnO et TiO₂ ou nanotubes de carbone, ce qui contribue à l'amélioration du développement de la plante (Khot *et al.*, 2012). En plus de la sensibilité ou la tolérance de la plante, l'impact réel de ces nanoparticules dépend de leurs concentrations et propriétés physico-chimiques (distribution de taille et état de surface) (Lambrevia *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2010).

- Nanoparticules pour l'intensification durable en agriculture

Les nanoparticules trouvent également des applications dans le cadre de l'augmentation des rendements de production sans nuire à l'environnement, c'est le concept de l'intensification durable des cultures. Ce sont des systèmes de type nanofertilisants : des éléments nutritifs encapsulés dans des nanoparticules inorganiques, polymère ou lipidiques. Ils permettent l'immobilisation des nutriments et leur libération progressive dans le sol, ayant pour avantage de minimiser le lessivage tout en améliorant l'absorption des nutriments par les plantes (Liu et Lal, 2015).

D'une manière similaire, les nanoparticules ont aussi été utilisées afin d'encapsuler des actifs herbicides : paraquat (Grillo *et al.*, 2014), triazine (Clemente *et al.*, 2014), glyphosate (Lim *et al.*, 2013), atrazine (Kah *et al.*, 2014), imazapic et imazapir (Maruyama *et al.*, 2016). Les tests cytotoxiques et cytogénétiques ont montré que les formulations contenant les actifs nanoencapsulés étaient moins toxiques que les actifs seuls, et que l'efficacité de l'herbicide était améliorée par la nanoencapsulation. Ainsi, ces formulations permettraient de réduire les quantités des actifs herbicides utilisées ainsi que les impacts sur l'environnement et la santé humaine.

1.2. Insecticides encapsulés

Concernant plus particulièrement les insecticides, une des stratégies qui peut permettre l'amélioration de leur efficacité est leur encapsulation, entraînant ainsi une diminution des quantités utilisées comme souhaité par les recommandations des organismes réglementaires. L'encapsulation permet une protection de l'insecticide contre les phénomènes environnementaux (photolyse, lessivage, etc.) et contre les dégradations biologiques internes à l'insecte cible, assurerait une libération contrôlée des insecticides, et ainsi leur meilleure efficacité comme illustré par la figure 27, tout en diminuant les effets collatéraux affectant les espèces non-cibles, et l'homme.

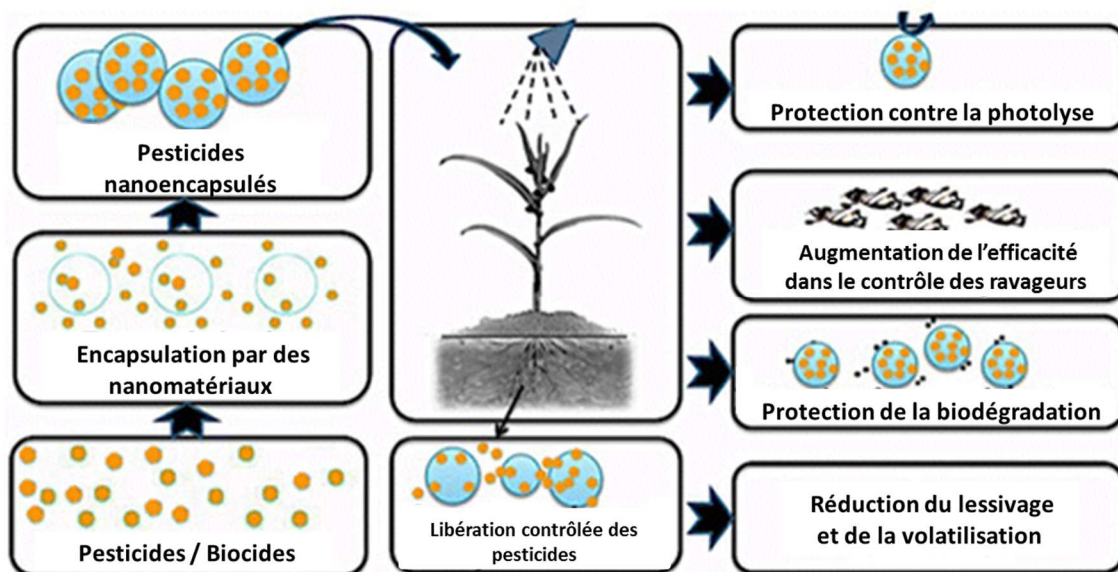


Figure 27: Encapsulation des insecticides et impacts attendus, qui permettrait de réduire l'utilisation de insecticides conventionnels et garantir leur application en toute sécurité (Nuruzzaman *et al.*, 2016)

L'utilisation des nanotechnologies en combinaison avec des insecticides est un procédé en développement à l'heure actuelle. Les assemblages et les procédés de formulation des nanoparticules sont adaptés suivant la nature de l'actif à encapsuler.

On retrouve dans la littérature diverses nanotechnologies ayant fait leur preuve pour l'encapsulation des insecticides telles que les nano ou microémulsions (stabilisées par des polymères ou des tensioactifs), les micelles (copolymères à base de polyéthylène glycol), les nanoparticules de polymères synthétiques (polyacrylate, acide polycitrique – polyéthylène glycol – acide polycitrique) ou naturels (chitosan et aginate), les nanomatériaux inorganiques poreux (silice), formulées par des procédés déjà connus et maîtrisés tels que la nanopréciptation, l'émulsification ou la double émulsification, l'émulsification-diffusion, l'émulsification-évaporation, le « layer-by-layer » (Nuruzzaman *et al.*, 2016).

Concernant les preuves de concept montrant les effets positifs de l'encapsulation, de nombreuses études impliquant divers insecticides : imidaclopride (Adak *et al.*, 2012) β -cyfluthrine (Loha *et al.*, 2012), thiaméthoxame (Sarkar *et al.*, 2012), benzoate d'émamectine (Shang *et al.*, 2013), deltaméthrine (Nguyen *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2013), tébuconazole (Qian *et al.*, 2013), bifenthrine (Liu *et al.*, 2008), montrent que les libérations des molécules actives sont plus soutenues et progressives dans le temps, donc

mieux contrôlées que celles des molécules actives contenues dans les formulations commerciales.

D'autres études ont montré des effets positifs concernant la photostabilité des insecticides. Nguyen *et al.* ont encapsulé la deltaméthrine dans des nanoparticules lipidiques solides (cire d'abeille), stabilisées par un recouvrement de chitosan, en utilisant un procédé de formulation classique par homogénéisation à haute température (homogénéisateur de type Ultra-Turax) et ultrason (Nguyen *et al.*, 2012). La distribution de taille des particules était relativement monomodale et monodisperse (Indice de polydispersité (PDI) < 0,2) avec un diamètre moyen de 200 nm, confirmé par diffusion dynamique de la lumière et microscopie électronique. L'efficacité d'encapsulation était correcte (environ 95%) dans les conditions optimales de formulation. Après irradiation sous UV (lampe à 280-360nm) pendant 24h (photolyse directe), environ 40% de deltaméthrine a été retrouvé dans les formulations de nanoparticules alors que seulement 15% était resté non dégradé pour une solution de deltaméthrine libre. Les mêmes résultats ont été obtenus avec une photolyse indirecte : il restait environ 75% de deltaméthrine pour les formulations de nanoparticules, contre seulement environ 40% de la deltaméthrine sous forme libre, montrant ainsi la valeur ajoutée des pesticides sous forme de nanoparticules. Des résultats similaires de photostabilité ont été obtenus lorsque le benzoate d'émamectine a été encapsulé dans des nanoparticules de polyacrylate (Shang *et al.*, 2013).

L'augmentation de l'efficacité des insecticides par l'intermédiaire de l'encapsulation a également été prouvée. Memarizadeth *et al.* ont encapsulé l'imidaclopride dans des nanoparticules polymère d'acide polycitrique - polyéthylène glycol - acide polycitrique par une méthode de nanopréciipitation (Memarizadeh *et al.*, 2014). Le diamètre moyen des nanoparticules, obtenu par microscopie électronique, était d'environ 20 nm, et des taux d'encapsulation relativement élevés. A pH basique et de par la nature du polymère, la libération de l'insecticide s'est faite de manière plus rapide qu'à pH neutre, soit une formulation optimale pour l'utilisation chez les insectes par ingestion (pH intestinal basique). Les formulations ont été testées sur insecte modèle (larves de *G. pyloalis*). Une concentration moins importante d'imidaclopride nanoencapsulé (300ppm) est nécessaire pour tuer 100% des larves après 96h par rapport à l'imidaclopride sous forme libre (500ppm), montrant une amélioration de l'efficacité de l'insecticide par la nanoencapsulation. Le même effet a été observé par Kumar *et al.* en encapsulant

l'imidaclopride dans des nanoparticules d'alginate, par un procédé d'émulsification (Kumar *et al.*, 2014). Les nanoparticules ont un diamètre moyen d'environ 150 nm confirmé par diffusion de la lumière et microscopie électronique, avec un taux d'encapsulation en imidaclopride quasi-total. Les formulations ont été testées sur champs (culture de 10 plantes âgées de 1 mois, sur champs de 1 m² avec des séparations de 1 m) comportant des cicadelles et les résultats ont montré une meilleure efficacité du pesticide encapsulé que de la formulation commerciale. Quinze jours après vaporisation des formulations, 100%, 33% et environ 5% des insectes (par rapport à un contrôle sans vaporisation) sont retrouvés avec l'utilisation de nanoparticules d'alginate vides, de la forme commerciale d'imidaclopride et de l'imidaclopride encapsulé, respectivement.

Finalement, la sécurité d'application des insecticides encapsulés a été prouvée. Frederiksen *et al.* ont encapsulé la gamma-cyhalothrine dans des microparticules solides composées de compritol® 888, et stabilisées par de l'alcool polyvinylique et de la polyvinylpyrrolidone (Frederiksen *et al.*, 2003), avec des diamètres de particules variant de 1 à 100 µm. De manière surprenante et allant à l'encontre de l'effet positif de l'encapsulation montré précédemment, la gamma-cyhalothrine encapsulée a eu la même activité insecticide que la formulation de gamma-cyhalothrine commerciale sur les insectes cibles (Nymphes de *Dysdercus cingulatus* et larves de *Spodoptera littoralis*). Ce manque d'efficacité accrue pourrait être expliqué par la taille et la polydispersité des microparticules, cette dernière bien souvent supérieure à celles des nanoparticules. Par contre, des essais de toxicité aquatiques ont été réalisés et ont montré que les formulations de microparticules ont été capables de diminuer la toxicité d'un facteur 10 pour les poissons (modèle de *Brachydanio rerio*) et d'un facteur environ 60 pour les daphnies (modèle *Daphnia magna*), comparativement à la formulation commerciale de gamma-cyhalothrine. L'aspect positif en matière de protection de l'environnement est ainsi mis en avant. Ao *et al.* ont conjugué de manière covalente l'acide 1-naphtylacétique à des nanoparticules de silice, afin de les associer aux semences de blé (Ao *et al.*, 2013). Des essais *in vitro* ont montré que les liaisons covalentes impliquées pouvaient se rompre sous certaines conditions de température et de pH, proches du milieu environnemental, entraînant une libération progressive et continue de l'insecticide lors de la germination et la croissance du blé. Alors que les semences enrobées d'acide 1-naphtylacétique libre présentent un développement de racine ralenti (moyenne de 9 racines par graine, d'une longueur moyenne de 3 cm, après 14 jours), l'utilisation de l'acide 1-naphtylacétique

nano-conjugué associé aux graines montre une meilleure efficacité lors de la germination (moyenne de 14 racines par graine, d'une longueur moyenne de 9 cm, après 14 jours). Par cette étude, l'aspect positif en matière de protection de la plante en culture est mis également en avant.

1.3. Objectifs du travail

Comme montré dans le chapitre précédent, la combinaison deltaméthrine / indoxacarbe améliore l'effet des insecticides par une action synergique tout en diminuant les doses d'insecticides utilisées. Néanmoins, un des problèmes majeurs avec les pyréthrinoides (en particulier la deltaméthrine) est que les insectes résistants peuvent métaboliser ces insecticides par une surexpression d'enzymes (estérases, monooxygénases) (Sogorb et Vilanova, 2002). Dans ce cas, les enzymes peuvent hydrolyser la deltaméthrine en composé non actif (détoxication), pouvant ainsi conduire à une diminution voire une perte de l'effet.

Afin de contourner les phénomènes de résistance par surexpression d'enzymes de détoxication, des agents tels que PBO et DEF ont été développés (Chen *et al.*, 2017; Khan *et al.*, 2013; Nikpour *et al.*, 2017; Saddiq *et al.*, 2017). Mais ces stratégies ne permettent pas une réduction significative de la concentration en principe actif utilisée. Par conséquent, la stratégie proposée dans ce travail de thèse repose sur la nanoencapsulation de la deltaméthrine afin de la protéger des estérases pour l'utiliser comme agent synergisant à plus faible concentration.

L'objectif de ce chapitre consiste donc en la production de nanocapsules contenant la deltaméthrine. Du fait du fort caractère lipophile de la deltaméthrine, les nanocapsules lipidiques (à cœur lipophile) (LNC) semblent être une nanocapsule de choix et le laboratoire MiNT (INSERM U1066 / CNRS 6021 à Angers) développe ce type de nano-objet. Ainsi, après formulation et encapsulation de la deltaméthrine dans les LNC, leurs paramètres physico-chimiques ont été déterminés (distribution de taille, taux d'encapsulation). Une étude de stabilité des LNC a été menée à différentes valeurs de pH afin de vérifier que leur utilisation peut être optimale dans le cas d'une ingestion par l'insecte. Finalement, des essais de stabilité de la deltaméthrine en présence d'estérases ont été menés pour montrer la valeur ajoutée de l'utilisation des LNC.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel

Le Kolliphor[®] HS-15 (Kolliphor) (agent tensioactif non ionique, mélange de polyéthylène glycol 660 Da libre et le polyéthylène glycol 660 Da hydroxy stéarate) a été fourni par BASF (Ludwigshafen, Allemagne). Le Lipoid[®] 75-3 (Lipoïd) (lécithine de soja comprenant 69% de phosphatidylcholine) a été acheté chez Lipoïde GmbH (Ludwigshafen, Allemagne). Le Labrafac[®] WL 1349 (Labrafac) (triglycérides d'acide caprique et caprylique) a été fourni par Gattefossé SA (Saint-Priest, France). Le chlorure de sodium (NaCl), le DMSO, les estérases de foie de porc (Estérase), le méthanol et la deltaméthrine (DLT) ont été commandés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). L'acétonitrile a été achetée chez Fisher Scientific (Illkirch, France). L'eau dé-ionisée provient d'un système Milli[®] RO de chez Millipore (Billerica, MA, USA).

2.2. Formulation des nanocapsules lipidiques et des nanocapsules lipidiques chargées en deltaméthrine

Pour réaliser les LNC, la procédure a été la suivante : 846 mg de Kolliphor, 75 mg de Lipoid, 1028 mg de Labrafac, 89 mg de NaCl et 2962 mg d'eau dé-ionisée ont été pesés avec précision. Sous agitation magnétique continue, le mélange a été soumis à trois cycles de température : chauffage jusqu'à 90°C et refroidissement jusqu'à 60°C. Au cours de la dernière étape de refroidissement, à 75°C, 5 mL d'eau dé-ionisée à 4°C ont été rapidement ajoutés dans la solution pour obtenir la formation des LNC en suspension (figure 28).

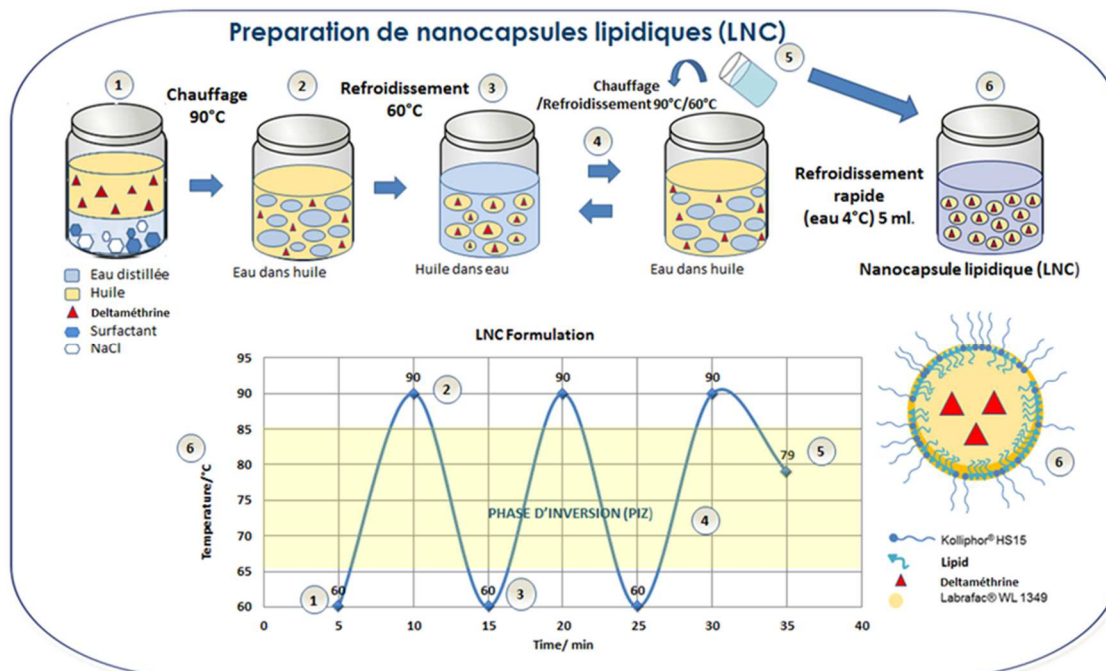


Figure 28: Procédé de formulation des nanocapsules lipidiques chargées en deltaméthrine (LNC-DLT), adapté du procédé de formulation des nanocapsules lipidiques dites blanches (LNC) (Bastiat et al., 2012, 2013; Heurtault et al., 2002).

Pour les nanocapsules lipidiques chargées en deltaméthrine (LNC-DLT), la DLT sous forme de poudre est préalablement solubilisée dans le Labrafac à une concentration de 1 mg.g^{-1} avant d'ajouter les autres constituants et de réaliser le procédé de formulation mentionné précédemment.

Les différentes suspensions : LNC et LNC-DLT ont été stockées à 4°C avant leur utilisation.

2.3. Purification des nanocapsules lipidiques

La suspension de LNC-DLT a été soumise à une centrifugation (10.000 g pendant 10 min). La suspension de LNC-DLT a également été filtrée sur filtre de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, Billerica, MA, USA). Les surnageants et les filtrats après centrifugation et filtration, respectivement, ont été récupérés et stockés à 4°C avant leur utilisation.

2.4. Etude de la stabilité des nanocapsules lipidiques chargées en deltaméthrine : effet du temps et du pH

La stabilité des LNC a été mesurée en fonction du temps et en fonction du pH. Les LNC ont été d'abord diluées (facteur de dilution 10 v/v) dans six solutions aqueuses dont le pH a été ajusté à 4, 6, 8, 10 et 12 à l'aide de solutions d'HCl ou NaOH. Le pH a été ajusté à l'aide d'un pH-mètre pH510 (Mettler Toledo, Viroflay, France). L'étude a été conduite sur une période de 2 jours à température ambiante.

2.5. Etude de la dégradation par les estérases de la deltaméthrine et de la deltaméthrine nanoencapsulée

Un mL de LNC-DLT a été mélangé avec 50 μ L d'estérases dans de l'eau dé-ionisée. Vingt μ L de DLT dans du DMSO ont été mélangés à 980 μ L d'eau dé-ionisé et 50 μ L d'estérases dans de l'eau dé-ionisée ont été ajoutés. Les concentrations finales en deltaméthrine et en estérases dans ces 2 expériences sont de 95 et 0,52 μ g.mL⁻¹ (correspondant à 0,009 U.mL⁻¹), respectivement. Le pH a été ajusté à 8,3 pour ces 2 expériences. Sous agitation magnétique et à température ambiante, 50 μ L de chaque mélange ont été prélevés régulièrement : 5 min, 30 min, 1 h, 1 h 30, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h et 24 h, complétés directement avec 950 μ L de méthanol et stockés à 4°C.

2.6. Caractérisation par diffusion de la lumière

La distribution de taille : le diamètre hydrodynamique (Z-ave) et l'indice de polydispersité (PdI) des LNC et LNC-DLT, avant et après purification, et au cours de l'étude de stabilité en fonction du pH, a été mesurée en utilisant un Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, Royaume-Uni). Le principe de l'instrument est la diffusion de la lumière quasi-élastique. Il est équipé d'un laser hélium-néon de 4 mW, avec une longueur d'onde de 633 nm et un angle de diffusion fixé à 173°. Les fonctions de corrélation ont été ajustées en utilisant l'approche des Cumulants pour les déterminations du Z-ave et du PdI. Toutes les mesures ont été effectuées à 25°C sur des suspensions de LNC-DLT et LNC, diluées dans de l'eau dé-ionisée par un facteur de 60 (v/v) (étude de purification), et par un facteur de 6 (v/v) (étude de stabilité en fonction du pH).

2.7. Caractérisation par chromatographie

Le taux d'encapsulation en deltaméthrine des LNC-DLT avant et après purification a été déterminé par une méthode chromatographique. Pour ce faire, 50 µL de LNC-DLT ont été mélangés avec 950 µL de méthanol et les mélanges ont été vigoureusement vortexés pour dissoudre les LNCs, détruisant leur structure et permettant la libération de la DLT soluble dans le méthanol. Pour les suspensions de LNC-DLT et les solutions de DLT concernées par la dégradation par les estérases, cette étape a déjà été réalisée après les prélèvements afin d'arrêter la dégradation enzymatique et les échantillons seront utilisés tels quels.

Ces solutions ont été filtrées sur filtre 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA) avant le dosage de la DLT, réalisé à l'aide d'un système UPLC (Waters, France). Une colonne analytique C18 (ACQUITY UPLC BEH C18® 1,7µm 2,1 x 50 mm, Waters, France) a été utilisée à 40°C. La phase mobile est constituée d'un mélange acétonitrile : eau dé-ionisée. Une succession de conditions de type gradient ou isocratique a été appliquée : gradient de 0,7:0,3 à 1:0 (v/v) entre 0 et 1 min; isocratique à 1:0 (v/v) jusqu'à 2 min; gradient de 1:0 à 0,7:0,3 (v/v) entre 2 et 3 min; et isocratique à 0,7:0,3 (v/v) jusqu'à 5 min. Le débit était de 0,4 mL.min⁻¹ et le volume d'injection était de 5 µL. La DLT a été quantifiée (temps de rétention: 1,65 min) par un détecteur UV ($\lambda = 266$ nm).

La courbe d'étalonnage a été établie en quantifiant l'aire sous les courbes de solutions étalons de DLT (50 µL de suspension de LNC et 950 µL de DLT dans le méthanol) avec une gamme de concentration finale de DLT variant de 0 à 5 µg.mL⁻¹.

Les efficacités d'encapsulation (EE) de DLT dans les LNC-DLT, avant et après les processus de purification ont été calculées en utilisant l'équation suivante :

$$(3) \quad EE(\%) = \frac{\text{Quantité expérimentale de DLT dans les LNCs} \times 100}{\text{Quantité théorique du DLT dans les LNCs}}$$

3. Résultats

3.1. Les nanocapsules lipidiques et les nanocapsules lipidiques chargées en deltaméthrine

La formulation des nanocapsules lipidiques de deltaméthrine (LNC-DLT) a été adaptée de celle des nanocapsules lipidiques dites blanches (LNC), non chargées en principe actif, qui est basée sur une technique d'inversion de phases par la température, un moyen simple et efficace pour la production de ces nanoparticules (Bastiat *et al.*, 2013; Heurtault *et al.*, 2002). Brièvement, à partir d'un mélange huile (Labrafac), eau et tensioactifs (Lipoïd et Kolliphor), il s'agit de passer d'une émulsion huile-dans-eau à une émulsion eau-dans-huile en augmentant la température, et inversement. La transition se fait par un phénomène de microémulsion au moment de la zone d'inversion de phases, que l'on fractionne par un ajout d'eau froide lors du dernier cycle, entraînant ainsi la formation de LNC (figure 28). Sous une composition particulière en huile et tensioactifs, des LNCs en suspension avec un diamètre moyen de 50 nm peuvent être obtenues avec une distribution de taille monomodale et monodisperse ($PdI < 0,1$) (Tableau 4).

Ces nanoparticules sont composées d'un cœur lipophile de Labrafac, stabilisé par une monocouche structurée de Lipoïd et Kolliphor. Ainsi, les LNC sont un des vecteurs propices à l'encapsulation d'une molécule lipophile telle que la deltaméthrine ($\text{LogP} = 6,2$) (Hansch *et al.*, 1995). Le procédé de formulation a été adapté en solubilisant au départ la DLT dans le Labrafac, avant de procéder à l'inversion de phases. Après formulation, les LNC-DLT ont une distribution de taille similaire à celle des LNC sans DLT. L'ajout de DLT à la concentration de $1\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de Labrafac ne modifie pas les LNC, avec des valeurs identiques de Z-Ave et PdI. De plus après dosage de la DLT par chromatographie, 100% de la quantité de DLT mis au départ dans la formulation est retrouvée montrant que le procédé par inversion de phases avec la température n'altère pas l'actif, même à une température de 90°C (Tableau 4).

Deux procédés de purification basiques ont été utilisés afin de vérifier si la DLT était bien totalement encapsulée dans les LNC-DLT. Il s'agit de la centrifugation et de la filtration. A la concentration utilisée, la nature très lipophile de la DLT devrait entraîner la formation d'agrégats insolubles dans l'eau si celle-ci n'est pas encapsulée dans le cœur des LNC-DLT. En effet, le seuil de solubilité de la DLT dans l'eau est inférieur à $0,002\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (MacBean, 2009). Ainsi, après filtration, les agrégats solides non solubles dans

l'eau devraient être retenus sur le filtre ; ou alors après centrifugation, ils devraient se retrouver dans le culot.

Après filtration et centrifugation, les distributions de taille des LNC-DLT ne sont pas modifiées comparativement à avant filtration et centrifugation, montrant que les LNC-DLT ne sont pas affectées par ces procédés de purification. Les résultats des efficacités d'encapsulation montrent que la totalité de la DLT est retrouvée quel que soit le procédé de purification (Tableau 4). Ainsi, lors de la formulation, en utilisant la DLT à une concentration de 1mg.g^{-1} dans du Labrafac, la DLT se retrouve totalement encapsulée dans les LNC-DLT. Aucun procédé de purification ne sera nécessaire par la suite.

Des agrégats de DLT présents dans la suspension de LNC-DLT auraient pu aussi être observés lors de la mesure de distribution de taille, affectant principalement la valeur du PdI. Des valeurs de PdI plus importantes auraient signifié une distribution de taille moins monodisperse et donc la présence de plusieurs objets en suspension, de différentes tailles, comme par exemples des LNC et des agrégats de DLT. Le fait que la distribution de taille n'est pas affectée lorsque la DLT est encapsulée est une première preuve de l'efficacité totale d'encapsulation de la DLT.

Tableau 4: Distribution de taille (diamètre hydrodynamique (Z-Ave) et indice de polydispersité (PdI)) et efficacité d'encapsulation (EE) des LNC et LNC-DLT en suspension, avant et après purification par filtration ou centrifugation (n = 5 - 10, moyenne \pm écart-type).

#	Z-Ave (nm)	PdI	EE (%)
LNC	55 ± 2	$0,06 \pm 0,03$	---
LNC-DLT	57 ± 3	$0,07 \pm 0,02$	97 ± 3
LNC-DLT après filtration	56 ± 2	$0,07 \pm 0,02$	101 ± 3
LNC-DLT après centrifugation	56 ± 3	$0,06 \pm 0,02$	101 ± 2

3.2. Stabilité des nanocapsules lipidiques en fonction du pH

Les insecticides utilisés dans l'étude sont administrés par ingestion aux blattes, entraînant une intoxication par voie orale. Ainsi, il est nécessaire que les LNC-DLT soient

stables par cette voie d'administration, et notamment aux valeurs basiques de pH dans le tractus intestinal de ces insectes (Engel et Moran, 2013).

Ainsi, les distributions de taille des LNC-DLT ont été mesurées après incubation *in vitro* à différentes valeurs de pH, de 4 à 12, pendant 48h à température ambiante. Quelles que soient les valeurs de pH, les valeurs de Z-Ave et de PdI restent constantes sur une durée de 48h (Tableau 5). Ainsi, les distributions de tailles de LNC-DLT ne sont pas modifiées notamment aux pH basiques, ce qui signifie que les objets restent stables. Les LNC-DLT ne sont pas dégradées, ce qui laisse supposer que la DLT reste toujours encapsulée au cœur des LNC-DLT.

Tableau 5: Distribution de taille (diamètre hydrodynamique (Z-Ave) et indice de polydispersité (PdI)) des LNC-DLT en suspension, à différents pH et au cours du temps (n = 3, moyenne moyenne \pm écart-type).

		pH				
Time		4	6	8	10	12
Z-Ave (nm)	2 h	55 \pm 1	54 \pm 2	55 \pm 2	55 \pm 2	54 \pm 2
PdI		0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,07 \pm 0,03	0,05 \pm 0,01
Z-Ave (nm)	6 h	56 \pm 3	54 \pm 1	54 \pm 2	54 \pm 2	54 \pm 3
PdI		0,06 \pm 0,03	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01
Z-Ave (nm)	24 h	55 \pm 2	54 \pm 1	54 \pm 1	55 \pm 1	53 \pm 1
PdI		0,07 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02
Z-Ave (nm)	48 h	55 \pm 2	55 \pm 2	55 \pm 1	54 \pm 1	54 \pm 1
PdI		0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,03	0,06 \pm 0,01

3.3. Protection de la deltaméthrine des estérases par les nanocapsules lipidiques

Comme indiqué dans les objectifs de ce chapitre, un des problèmes les plus importants avec les pyréthrinoides et en particulier la DLT est une surexpression enzymatique chez les insectes résistants, capable de catalyser l'hydrolyse de la DLT en un composé non toxique et/ou non actif (Sogorb et Vilanova, 2002). Ainsi, l'encapsulation de la DLT dans des nanocapsules lipidiques pourrait être une stratégie de protection

enzymatique, plutôt que l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques tels que le PBO comme couramment utilisé dans les formulations d'insecticide classique.

Afin de confirmer que les nanocapsules lipidiques sont capables de protéger la DLT d'une dégradation enzymatique, une incubation de DLT libre en solution et de LNC-DLT a été réalisée en présence d'estérase. Une dégradation progressive de la DLT est observée jusqu'à une perte de 60% après 24 h d'incubation avec l'estérase, lorsque la DLT est libre en solution. Par contre, lorsque la DLT est nano-encapsulée (LNC-DLT), aucune dégradation n'est observée jusqu'à 24 h (Figure 29). Ainsi, les nanocapsules lipidiques assurent bien une protection à la DLT au moins jusqu'à 24 h et pourraient permettre d'améliorer l'action de cet insecticide chez les insectes résistants aux pyréthrinoides.

De plus, cette expérience confirme de manière indirecte la stabilité de l'encapsulation de la DLT au cœur des nanocapsules lipidiques au moins jusqu'à 24 h. Des expériences plus directes de libération auraient pu également venir confirmer cette stabilité mais elles sont trop difficiles à mettre en place vu le seuil de solubilité très faible de la DLT, sans utiliser de biais expérimentaux (LNC-DLT dialysées contre un milieu aqueux externe contenant des micelles par exemple), qui n'ont aucune représentation *in vivo*.

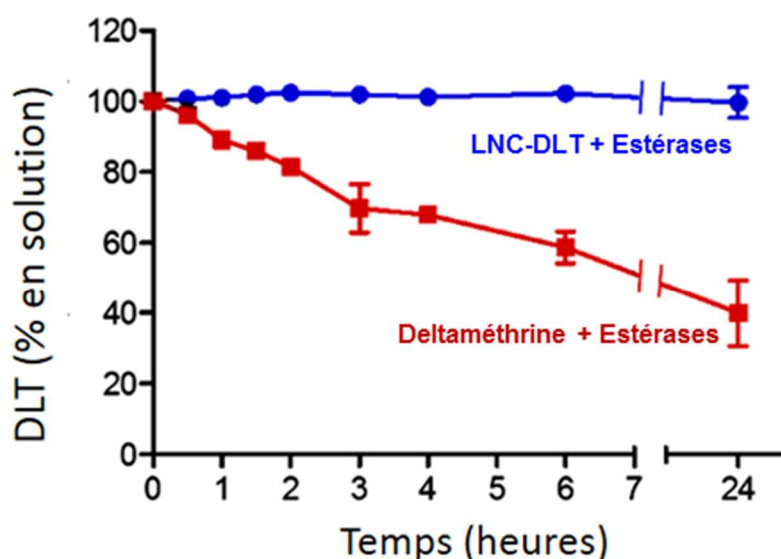


Figure 29: Protection enzymatique de la deltaméthrine par la nanoencapsulation. Evolution de la proportion (%) de deltaméthrine (DLT) en fonction du temps, encapsulée dans les LNCs (LNC-DLT) (■) ou en solution dans le mélange DMSO : eau dé-ionisée 1:49 (v/v) (●), en présence d'estérase (0,009 U.mL⁻¹) Concentration initiale en deltaméthrine : 95 µg.mL⁻¹. (n=3, moyenne ± écart-type).

4. Conclusion

Les nanocapsules lipidiques sont des nanoparticules de type nano-émulsion, et sont hautement stabilisées par une monocouche de tensioactifs qui se structure grâce au procédé de formulation par inversion de phases. La DLT, pyréthriinoïde très lipophile, peut être encapsulée avec une efficacité d'encapsulation totale, sans perturber le procédé de formulation. La stabilité à court terme (au moins 48 h) des LNC-DLT en suspension a été prouvée dans une gamme de pH variant de 4 à 12, avec une distribution de taille monomodale et monodisperse ($PdI < 0,1$) et un diamètre moyen proche de 50 nm.

Finalement, l'objectif fixé au départ a été rempli, avec une protection de la DLT nano-encapsulée face aux estérases, prouvant aussi la stabilité de l'encapsulation de la DLT, jusqu'à au moins 24 h. Ainsi, la DLT nano-encapsulée peut être utilisée *in vivo* comme agent synergisant de l'indoxacarbe sur le modèle utilisée dans le chapitre précédent afin de montrer une efficacité de l'action de cette association.

Partie 4 : Mise en évidence *in vivo* de l'optimisation de l'effet synergique par la nanoencapsulation de la deltaméthrine

1. Etude comparative des effets de la deltaméthrine seule par rapport à la deltaméthrine nanoencapsulée

Les effets de la deltaméthrine seule et de la deltaméthrine nanoencapsulée (LNC-DLT) ont été comparés déterminer les plus faibles concentrations de deltaméthrine nanoencapsulée à utiliser en association avec l'indoxacarbe. Pour réaliser cette expérience, des lots de 10 blattes ont été traités par voie orale avec 10 μ l de deltaméthrine et 10 μ l de deltaméthrine nanoencapsulée à différentes concentrations, de 10⁻⁷M à 10⁻⁴M à 24h, 48h et 72h (n = 4 à 17) (Figure 30). Les courbes effet-log concentration établies pour la LNC-DLT présentent des différences en termes de puissance, d'efficacité maximale et de pente à 24h, 48h et 72h par rapport à celles obtenues pour la deltaméthrine seule. Les CE₅₀ estimés à 24h, 48h et 72h sont plus faibles (1,7 10⁻⁵M; 2,10⁻⁵M et 7,10⁻⁶M) que ceux déterminés avec la deltaméthrine seule (Tableau 3, partie 2). De plus les pentes des courbes effet-log concentration observées avec la LNC-DLT sont plus lentes (1,9; 1,1 et 0,9 respectivement à 24h, 48h et 72h) que celles déterminées avec la deltaméthrine seule (Tableau 3). Bien que la LNC-DLT produise une faible mortalité à 24h, les résultats montrent que l'effet de la LNC-DLT est plus fort que celui obtenu avec la deltaméthrine seule à 48h et 72h (p<0,001 et p<0,05 pour 10⁻⁵M, respectivement).

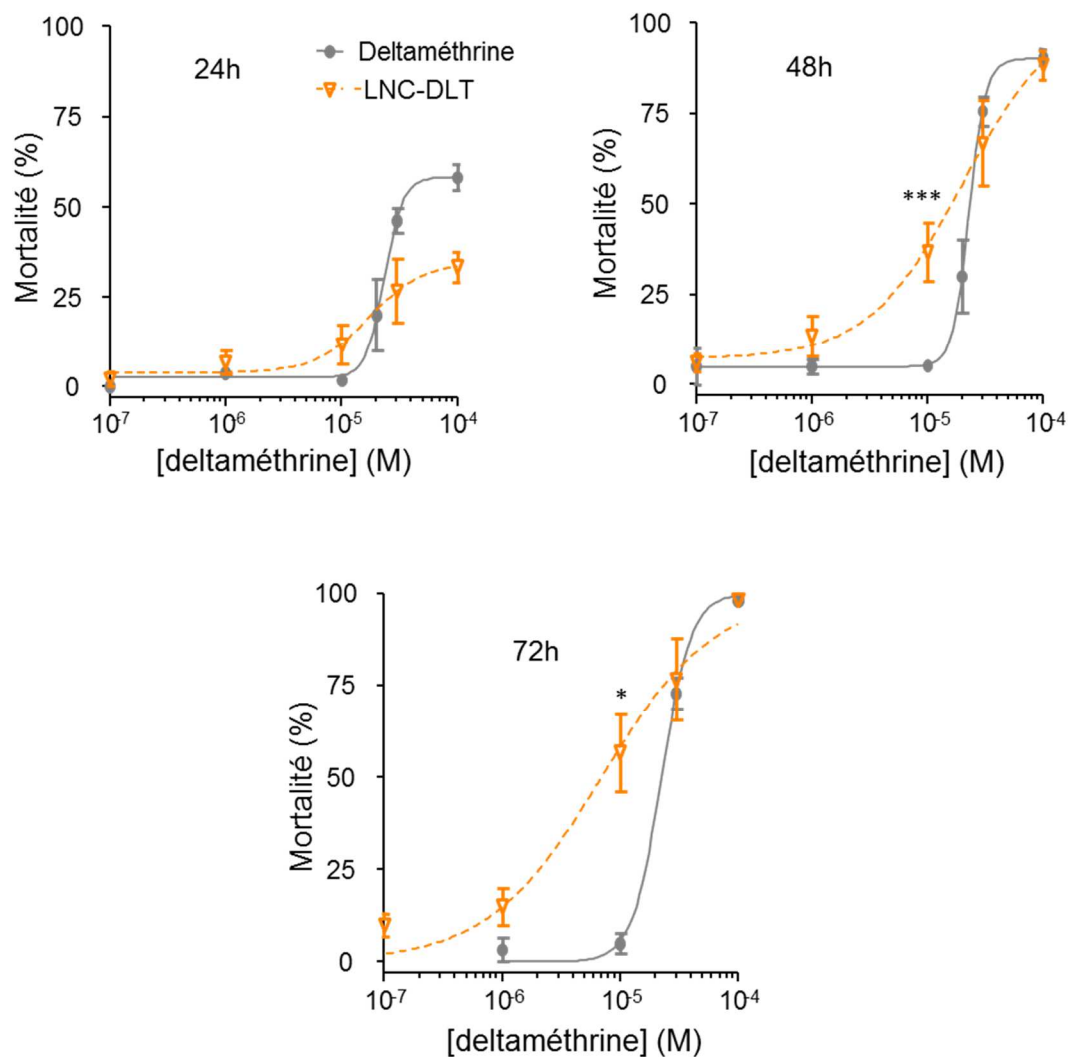


Figure 30: Comparaison des courbes effet-log concentration entre le pourcentage de mortalité obtenu avec la deltaméthrine (gris) et la LNC-deltaméthrine (orange) mesuré à 24h, 48h et 72h. Les courbes représentent les meilleurs ajustements par rapport aux valeurs moyennes selon l'équation (2). Les données sont des valeurs moyennes \pm S.E.M. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (n=4-17).

2. Optimisation de l'effet de l'indoxacarbe par la deltaméthrine nanoencapsulée

Ces expériences ont été réalisées pour étudier l'optimisation de l'effet de l'indoxacarbe par la deltaméthrine nanoencapsulée. Dans le cadre de cette expérimentation *in vivo*, les blattes ont été exposées à différentes concentrations d'indoxacarbe testé seul de 10^{-7} M à 10^{-5} M, en présence deltaméthrine à 10^{-6} M et de LNC-DLT à la même concentration. La mortalité des blattes a été déterminée à 24h, 48h et 72h (Figure 31). À 24h, n'y a pas de différence de mortalité quelles que soient les conditions expérimentales. En revanche. À 48h, le pourcentage de mortalité atteint $24 \pm 10\%$ ($n = 10$, $p < 0,01$) avec le mélange LNC-DLT 10^{-6} M et indoxacarbe 10^{-6} M. À 72h, le traitement avec le mélange LNC-DLT 10^{-6} M / indoxacarbe 10^{-6} M a permis d'obtenir l'effet significatif le plus important sur la mortalité ($40 \pm 14\%$, $n = 9$, $p < 0,01$), par rapport à l'indoxacarbe seul ou associé avec la deltaméthrine.

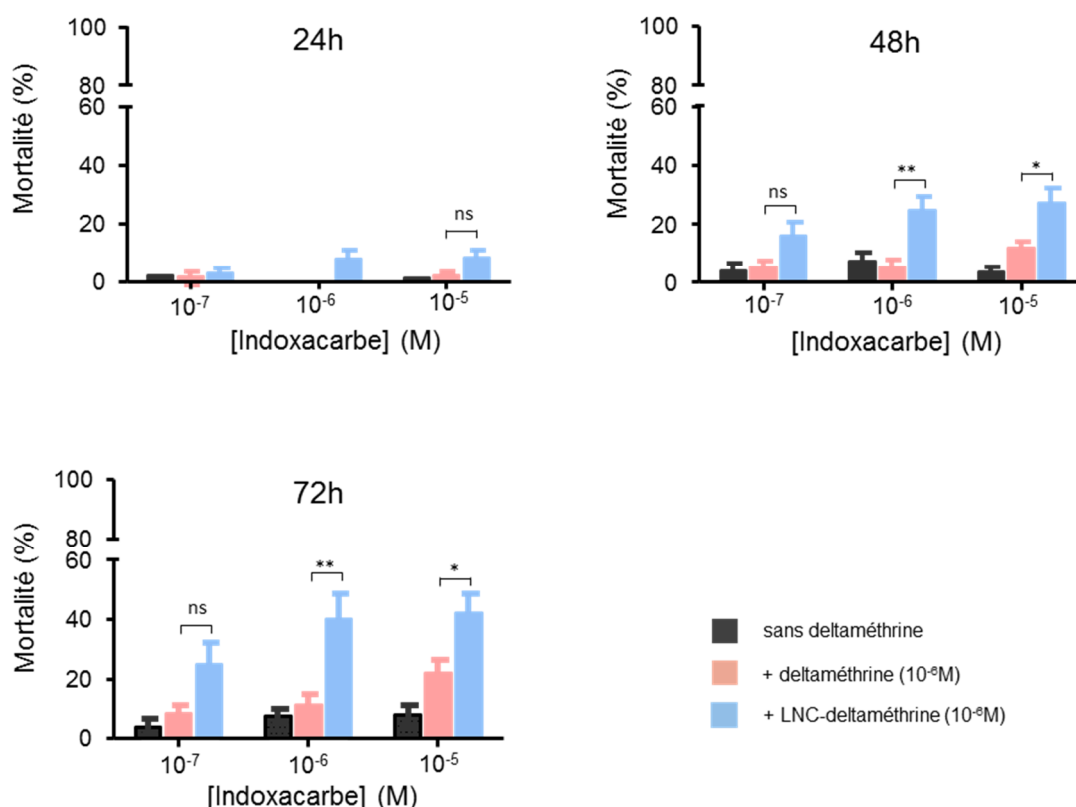


Figure 31: Histogrammes comparatifs du pourcentage de mortalité obtenue en présence de deltaméthrine et de deltaméthrine nanoencapsulée utilisée à 10^{-6} M en fonction de différentes concentrations d'indoxacarbe (10^{-7} M, 10^{-6} M et 10^{-5} M) à 24h, 48h et 72h. Les données sont des

valeurs moyennes \pm S.E.M. ns (non significatif) $p > 0.05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$, (n=5 à 10). Les taux de mortalité mesurés sans deltaméthrine sont indiqués sur le graphe à titre indicatif.

Pour exprimer quantitativement la synergie obtenue avec la deltaméthrine nanoencapsulée et l'indoxacarbe, l'indice de combinaison (IC) a été calculé à partir de l'équation (2) (cf. matériels et méthodes la partie 2). Comme indiqué dans le tableau 6, l'IC déterminé de l'association LNC-DLT 10^{-6} M / indoxacarbe 10^{-6} M est supérieur à celui calculé pour l'association deltaméthrine 10^{-6} M / indoxacarbe 10^{-6} M. Pour l'association LNC-DLT 10^{-6} M / indoxacarbe 10^{-6} M, l'IC est environ 3 fois plus faible que celui de l'association deltaméthrine 10^{-6} M / indoxacarbe 10^{-6} M.

Tableau 6: Indice de combinaison des mélanges d'insecticides sur la blatte (*Periplaneta americana*), après 72h d'exposition

Mélange insecticides (1 + 2)	[insecticide 1] CL ₂₀ (M) (95%CI)	[insecticide 2] CL ₂₀ (M) (95%CI)	[insecticides 1 + 2] CL ₂₀ (M) (95%CI)	IC ^a
DLT + IND	$1.5 \cdot 10^{-5}$ ($1.2 \cdot 10^{-5}$ - $1.9 \cdot 10^{-5}$) ⁵⁾	$1.7 \cdot 10^{-4}$ ($8.2 \cdot 10^{-5}$ - $3.4 \cdot 10^{-4}$) ⁴⁾	$6.5 \cdot 10^{-6}$ ($2.2 \cdot 10^{-6}$ - $1.9 \cdot 10^{-5}$) ⁵⁾	0.49
LNC-DLT / IND	$1.5 \cdot 10^{-6}$ ($5.9 \cdot 10^{-7}$ - $3.8 \cdot 10^{-6}$) ⁶⁾	$1.7 \cdot 10^{-4}$ ($8.2 \cdot 10^{-5}$ - $3.4 \cdot 10^{-4}$) ⁴⁾	$2.6 \cdot 10^{-7}$ ($5.3 \cdot 10^{-8}$ - $1.3 \cdot 10^{-6}$) ⁶⁾	0.17

DLT : deltaméthrine 10^{-6} M; LNC-DLT : deltaméthrine nanoencapsulée 10^{-6} M; IND : indoxacarbe 10^{-6} M; CL₂₀ : concentration létale qui produit 20% de mortalité; ^aIC: Indice de combinaison à CL₂₀.

Le résultat de cette étude comparative montre que la deltaméthrine nanoencapsulée 10^{-6} M augmente significativement l'effet de l'indoxacarbe à 10^{-6} M à 48h et à 72h.

3. Etude comparative des effets produits par les combinaisons deltaméthrine / PBO / indoxacarbe et LNC-deltaméthrine / indoxacarbe

L'efficacité de notre formulation LNC-DLT 10^{-6} M / indoxacarbe 10^{-6} M repose sur l'hypothèse d'une protection par la nanoencapsulation de l'agent synergisant, la deltaméthrine, vis-à-vis des estérases et des monooxygénases des insectes. Des expérimentations *in vivo* ont été réalisées pour déterminer le bénéfice d'une association

LNC-DLT $10^{-6}M$ / indoxacarbe $10^{-6}M$ *versus* une association deltaméthrine $10^{-6}M$ / PBO / indoxacarbe $10^{-6}M$ sur la mortalité des blattes à 48h et 72h (Figure 32).

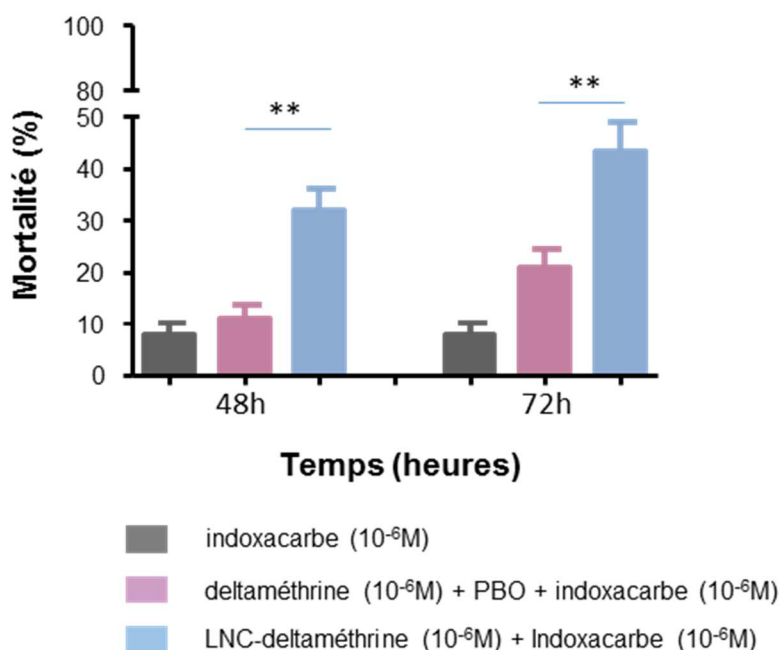


Figure 32: Histogrammes comparatifs du pourcentage de mortalité obtenu avec l'indoxacarbe seul $10^{-6}M$, la deltaméthrine $10^{-6}M$ en présence de PBO et d'indoxacarbe $10^{-6}M$ et la deltaméthrine nanoencapsulée $10^{-6}M$ avec l'indoxacarbe $10^{-6}M$ à 48h et 72h. Les données sont des valeurs moyennes \pm S.E.M. $**p < 0,01$ ($n=4-10$). Les taux de mortalité mesurés avec l'indoxacarbe $10^{-6}M$ sont indiqués sur le graphe à titre indicatif.

Nous avons montré que le pourcentage de mortalité est plus important avec le mélange LNC-DLT $10^{-6}M$ / indoxacarbe $10^{-6}M$ ($p < 0,01$) que celui obtenu avec l'association deltaméthrine / indoxacarbe en présence de PBO. Les résultats obtenus confirment que la nanoencapsulation de la deltaméthrine permet d'obtenir une meilleure efficacité de l'association par rapport au PBO.

4. Conclusion

L'ensemble de ces résultats permet de dégager trois points principaux :

- détermination de la plus faible concentration de deltaméthrine nanoencapsulée à utiliser avec l'indoxacarbe
- détermination des concentrations optimales de deltaméthrine nanoencapsulée associée à l'indoxacarbe pour produire le plus fort pourcentage de mortalité en fonction de la durée d'exposition
- optimisation de l'effet de l'association *via* une meilleure protection de la deltaméthrine par la nanoencapsulation vis-à-vis des enzymes de détoxification.

Partie 5 : Discussion – Perspectives

1. Intérêt de la nanoencapsulation de la deltaméthrine pour améliorer l'efficacité de l'association deltaméthrine / indoxacarbe

La deltaméthrine, pyréthrianoïde de type II, est un insecticide connu pour agir sur les canaux sodium dépendants du potentiel en ralentissant la cinétique d'activation et en induisant une augmentation de l'amplitude de la queue de courant de désactivation (Shafer *et al.*, 2005). Ces effets sont associés à une dépolarisation du potentiel de membrane à l'état stable, ce qui résulte d'une inhibition du potentiel d'action. Des études *in vitro* réalisées dans le laboratoire SiFCIR sur des cellules neurosécrétrices de blattes (*Periplaneta americana*) ont mis en évidence un effet de la deltaméthrine inattendu sur l'efficacité du DCJW. Dans ce cas, la deltaméthrine qui n'est pas utilisée comme un insecticide mais plutôt comme un agent synergisant (Deshayes *et al.*, 2018) provoque une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. Nous avons montré que la deltaméthrine induit une inversion de l'échangeur Na/Ca qui régule les concentrations intracellulaires des ions calcium et sodium. L'augmentation du calcium intracellulaire potentialise l'effet inhibiteur du DCJW utilisé à une concentration plus faible. L'augmentation de calcium intracellulaire induite par la deltaméthrine est essentielle pour augmenter la sensibilité des canaux sodium dépendants du potentiel au DCJW (Lavialle-Defaix *et al.*, 2010, Flochlay-Sigognault *et al.*, 2014, Pitti Caballero *et al.*, 2019 voir annexe 2).

Afin de compléter les résultats obtenus *in vitro*, nous avons montré dans ce travail de thèse que l'effet synergique de l'association deltaméthrine/indoxacarbe était également observé *in vivo* sur des blattes mâles adultes (*Periplaneta americana*). Cependant, l'un des problèmes les plus fréquemment rencontrés avec les insecticides pyréthrianoïdes, et en particulier la deltaméthrine, est que les insectes peuvent dégrader ces molécules par une surexpression d'enzymes métaboliques impliquées dans la détoxification (Sogorb et Vilanova, 2002). Dans ce contexte, les résultats obtenus *in vivo* avec la deltaméthrine associée au PBO (synergiste utilisé dans des formulations classiques) révèlent effectivement une meilleure efficacité de la deltaméthrine sur la mortalité des blattes. Ce qui confirme l'implication des enzymes de détoxification dans

l'effet de la deltaméthrine. Un autre paramètre pris en considération est la biotransformation de l'indoxacarbe en DCJW par les estérases chez l'insecte. En effet, pour observer *in vivo* la synergie entre la deltaméthrine et le DCJW (métabolite de l'indoxacarbe), il est nécessaire de protéger la deltaméthrine d'une dégradation prématurée par les estérases. La nanoencapsulation pourrait aider à obtenir une libération lente de deltaméthrine pour provoquer une entrée prolongée de sodium dans la cellule, essentielle à l'augmentation du calcium intracellulaire *via* l'échangeur Na/Ca en mode inverse. Dans ce but une stratégie alternative basée sur la nanoencapsulation de la deltaméthrine, utilisée comme agent synergisant, a été développée. Les résultats démontrent une meilleure efficacité de l'association deltaméthrine /indoxacarbe sur le pourcentage de mortalité des blattes lorsque la deltaméthrine est nanoencapsulée par rapport aux résultats obtenus avec le PBO. La biotransformation de l'indoxacarbe en DCJW catalysée par des estérases/amidases et la libération lente de deltaméthrine de la nanocapsule permettent de produire une meilleure efficacité du traitement mais avec des concentrations plus faibles de l'insecticide (Figure 33).

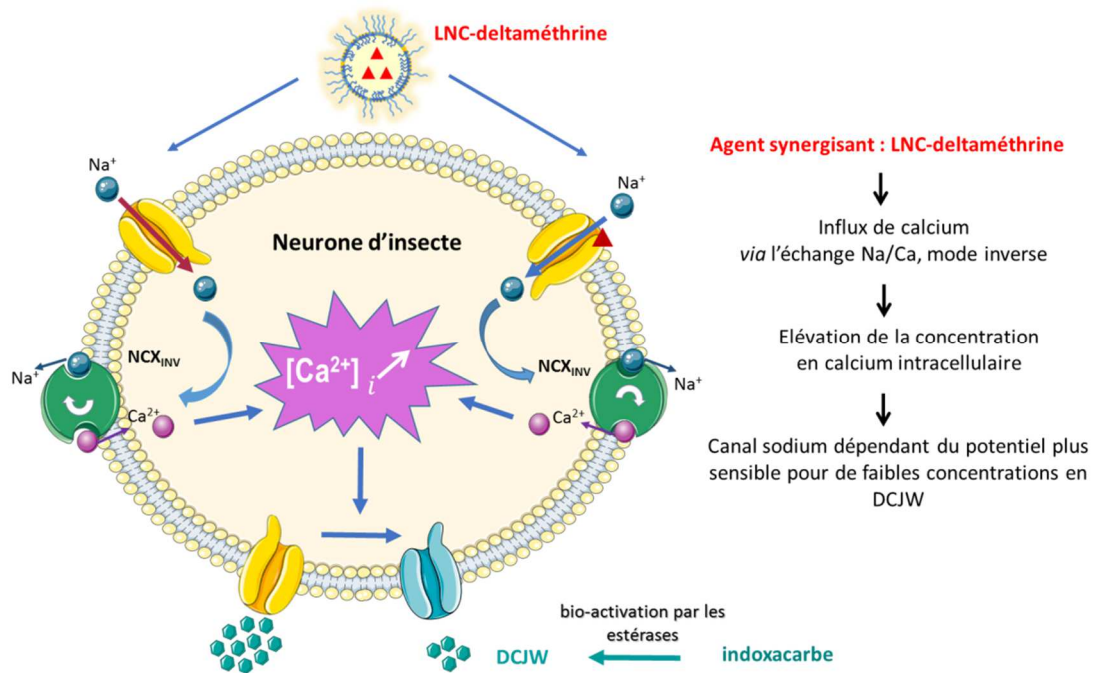


Figure 33: Schéma hypothétique qui résume la stratégie proposée pour optimiser l'effet du DCJW et de l'indoxacarbe par la deltaméthrine utilisée comme agent synergisant. La modulation des canaux sodium dépendants du potentiel induite par la deltaméthrine nanoencapsulée (LNC-deltaméthrine) entraîne une augmentation de la concentration de sodium intracellulaire ainsi qu'une dépolarisation membranaire qui favorise l'influx de calcium *via* l'échange Na/Ca , mode inverse. L'élévation de la concentration de calcium intracellulaire augmente la sensibilité du canal sodium dépendant du potentiel pour de faibles concentrations de DCJW. La nanoencapsulation protège la deltaméthrine d'une attaque enzymatique induite par les estérases, essentielles pour bio-activer l'indoxacarbe en DCJW.

2. Stratégie de nanoencapsulation pour l'application sur champs des mélanges deltaméthrine / indoxacarbe

Au cours de ce travail de thèse, l'importance des concentrations de deltaméthrine et d'indoxacarbe pour obtenir une meilleure efficacité a également été démontrée (e.g. Figures 24 et 31). Ainsi, lors de l'application sur champs, il est nécessaire que les insectes nuisibles ingèrent l'agent synergisant et l'insecticide dans des proportions optimales pour obtenir le meilleur effet du traitement. Cependant, les conditions environnementales telles que le vent, l'humidité, les UV, la sécheresse peuvent entraîner une modification de la disponibilité des deux substances actives (van den Berg *et al.*, 1999 ; Bedos *et al.*, 2002), ce qui va certainement diminuer de manière très significative la probabilité que l'insecte nuisible soit intoxiqué. Dans notre étude effectuée au laboratoire, l'association des LNC-DLT avec l'indoxacarbe montrent une synergie améliorée (Figure 31) mais il sera nécessaire d'évaluer leur efficacité en matière de toxicité, en conditions réelles. En fonction des résultats obtenus, on pourrait également envisager de co-localiser la deltaméthrine et l'indoxacarbe dans des nanoparticules solides, de type nanoparticules polymère ou nanocapsules lipidiques solides. De plus, l'utilisation de ces nanoparticules offrirait la possibilité de fixer un rapport des doses optimales pour les deux molécules. Ces nanoparticules solides pourraient être utilisées sous forme sèche ou sous forme de suspension. Elles seraient dégradées plus lentement que des particules à cœur liquide de type liposome ou nanocapsules lipidiques liquides qui se dénaturent après évaporation de l'eau. Plusieurs études ont déjà montré la possibilité de nanoencapsuler des molécules actives dans ce type de nanoparticules solides (Nuruzzaman *et al.*, 2016). De façon complémentaire, la taille des nanocapsules ou des nanoparticules pourrait influencer la vitesse de distribution et la libération de l'agent synergisant dans l'organisme (Zolnik et Sadrieh, 2009, Meredith *et al.*, 2016). La taille des nanocapsules préparées pour cette étude étant d'environ 50 nm, il serait intéressant de réaliser le même type d'expérimentations avec des nanocapsules ou des nanoparticules de tailles différentes afin d'évaluer s'il existe une différence de toxicité. Les études de paramètres physiques qui influencent la stabilité des nanoparticules et des molécules actives : thermolyse, photolyse, hydrolyse, devront être réalisées en conditions réelles en champs.

Afin de montrer que la double encapsulation est possible, nous avons étudié la possibilité d'encapsuler l'indoxacarbe, en utilisant le modèle de LNC. A partir d'Avaunt® (émulsion concentrée d'indoxacarbe à 15%), nous avons optimisé des formulations de LNC-indoxacarbe. Ainsi, en utilisant le procédé par inversion de phases décrit précédemment, les résultats préliminaires ($n = 3$) ont montré que des LNCs ont été obtenues avec une distribution de taille monomodale et monodisperse et avec différentes concentrations d'indoxacarbe (Z-Ave = 53 ± 2 nm et PdI = $0,05 \pm 0,01$ pour une dose de 10 mg/g d'indoxacarbe dans la suspension, Z-Ave = 51 ± 1 nm et PdI = $0,05 \pm 0,01$ pour une dose de 30 mg/g d'indoxacarbe dans la suspension, et Z-Ave = 47 ± 1 nm et PdI = $0,07 \pm 0,01$ (moyenne \pm écart-type) pour une dose de 50 mg/g d'indoxacarbe dans la suspension). Les taux d'encapsulation sont totaux comme ceux qui avaient été obtenus pour la deltaméthrine (103 ± 2 , 104 ± 8 et $105 \pm 2\%$ (moyenne \pm écart-type) pour des doses de 10, 30 et 50 mg/g d'indoxacarbe dans la suspension, respectivement). Ainsi, la faisabilité de l'encapsulation de l'indoxacarbe a été démontrée. La double encapsulation ne semble pas être un obstacle incontournable mais il restera quand même une étape à surmonter pour avoir un effet synergique entre la deltaméthrine et l'indoxacarbe. En effet, une fois ingérée, l'indoxacarbe doit être libéré de la nanoparticule solide pour être biotransformé en DCJW. Par contre, la deltaméthrine doit être libérée plus tardivement de la nanoparticule afin d'optimiser l'effet du DCJW *via* l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Ainsi, il faudra développer pour les applications futures un système nanoparticulaire qui une fois ingéré par l'insecte nuisible entraînerait une libération rapide de l'indoxacarbe qui doit être bio-activé et une libération plus lente de la deltaméthrine. Des techniques de « layer-by-layer » avec des couches externes sensibles au pH basique du système digestif de l'insecte pourraient être envisagées (Nuruzzaman *et al.*, 2016).

Partie 6: Conclusion générale

Au terme de ce travail de thèse, les travaux présentés dans ce mémoire permettent d'élargir les connaissances sur le mode d'action de la deltaméthrine et de proposer une nouvelle stratégie de lutte pour contrôler les insectes nuisibles.

L'association entre un agent synergisant et un insecticide est une stratégie très intéressante. Le but principal de cette association est de réduire les doses d'insecticides utilisées tout en gardant une bonne efficacité du traitement. L'ensemble de ces travaux présentés dans ce mémoire ont conduit à formuler les conclusions suivantes :

- ✓ L'ensemble des résultats obtenus a montré que l'utilisation de la deltaméthrine comme agent synergisant de l'indoxacarbe permet d'optimiser l'efficacité du traitement et de réduire les doses d'indoxacarbe. Cet effet synergique s'explique par l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire induit par action de la deltaméthrine.
- ✓ L'effet synergique obtenu avec la deltaméthrine nanoencapsulée est plus important que celui de l'effet des formulations classiques d'insecticides couramment utilisés dans l'agriculture avec des synergistes. En effet, les effets de la combinaison de deltaméthrine nano-encapsulée avec l'indoxacarbe sont meilleurs que ceux obtenus avec l'association deltaméthrine / PBO.
- ✓ L'optimisation de l'effet synergique de cette association a été possible grâce au rôle protecteur de la nanocapsule de l'agent synergisant contre les estérases de l'insecte.

Les approches en termes de méthodologie développées ici constituent une première étape dans la mise au point d'une formulation phytosanitaire efficace qui pourrait être utilisée dans la lutte contre les insectes ravageurs de cultures. De plus, l'intérêt d'associer deltaméthrine comme agent synergisant de l'indoxacarbe semble être une bonne stratégie alternative dans la lutte contre les insectes résistants aux insecticides pyréthrinoides. Ainsi, des expérimentations pourraient être réalisées *in vivo* avec des insectes résistants problématiques en agriculture.

Afin d'être au plus proche des conditions réelles d'utilisation, il serait intéressant d'optimiser le processus de nanoencapsulation par l'utilisation de nanoparticules solides

capables de libérer de manière séquencée l'indoxacarbe en premier suivi d'une libération plus lente de la deltaméthrine.

Enfin, cette stratégie alternative doit pouvoir s'adapter aux conditions de traitements classiquement utilisées en agriculture. Des études seront donc nécessaires pour évaluer le meilleur procédé d'application de ce type de formulations (e.g. pulvérisation, nébulisation, etc...). Cette partie nécessitera l'établissement d'un partenariat avec des industries phytosanitaires spécialisées dans ce domaine. Il est important de noter que le développement d'une telle stratégie devra obligatoirement s'accompagner de tests écotoxicologiques OCDE sur organismes non-cibles comme les abeilles et des organismes aquatiques tels que les chironomes et les larves de daphnies.

Liste des figures

Figure 1: Estimations de la croissance de la population mondiale entre 1950 et 2100.....	13
Figure 2: Marché des pesticides au niveau mondial (<i>De Arnab et al., 2014</i>).....	14
Figure 3: Ventes des pesticides dans l'Union européenne 2016 (millions de kilogrammes)	14
Figure 4: Moyens de lutte contre les insectes ravageurs.	15
Figure 5: Le canal sodium dépendant du potentiel peut se présenter sous différents états: fermé, ouvert, inactivé. Au repos, la porte d'activation (rouge) est fermée et la porte d'inactivation (verte) est ouverte. Lors d'une dépolarisation, le canal sodium passe de l'état fermé à l'état ouvert, c'est l'activation qui permet de générer un influx d'ions sodium. Durant la dépolarisation, la porte d'inactivation se ferme. Ce mécanisme participe à la phase de repolarisation du potentiel d'action. A la fin du potentiel d'action, les portes d'activation et d'inactivation sont fermées. Il faut attendre un certain temps pour que la porte d'inactivation retrouve sa position initiale, c'est la réactivation (<i>D'après Dong et al., 2014</i>).	17
Figure 6: Structures chimiques des pyréthrinoides de type I et II.....	19
Figure 7: Illustration du mode d'action des pyréthrinoides de type I (A), contrôle (B) et pyréthrinoides de type II (C) (<i>modifié d'après Shafer et al., 2005</i>)	20
Figure 8: Structures chimiques du diflubenzuron, PH 60-41, de l'indoxacarbe et de son métabolite DCJW (<i>modifié d'après Silver et al., 2017</i>)	21
Figure 9: Structure chimique de l'indoxacarbe métabolisé en DCJW (<i>Wing et al., 2000</i>)	22
Figure 10: Effet du DCJW sur le courant entrant sodium enregistré sur des cellules neurosecrétrices d'un insecte, la blatte <i>Periplaneta americana</i> (<i>modifié d'après Lapied et al., 2001</i>).	22
Figure 11: Evolution de la résistance aux insecticides, herbicides et fongicides.....	23
Figure 12: Principaux mécanismes de résistance des insectes aux insecticides (<i>CNEV, 2014</i>)..	24
Figure 13: Exemple de mutations <i>kdr</i> et <i>super-kdr</i> sur la sous-unité α du canal sodium. Les mutations <i>kdr</i> sont représentées par des étoiles bleues et les mutations <i>super-kdr</i> , par des étoiles rouges (<i>d'après Dong, 2007</i>)	26
Figure 14: Mécanismes de résistance cuticulaire chez l'insecte. Les modifications cuticulaires proposées pour réduire la pénétration de l'insecticide: Résistant*: épaissement de l'épicuticule, Résistant**: épaissement de la pro-cuticule, Résistant***: composition altérée de la cuticule (<i>modifié d'après Balabanidou et al., 2018</i>)	29
Figure 15: Représentation schématique de l'entrée du baculovirus (A) et du densovirus (B) dans une cellule d'insecte (illustration à gauche) corrélée à une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) (A,B). La première étape de l'infection virale commence par l'entrée du virus dans la cellule de l'insecte par la fusion des membranes cellulaires et virales ou par	

endocytose clathrine-dépendante, permettant la distribution du virus dans le cytoplasme (1). L'entrée du virus dans la cellule induit une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (A, B et C) *via* un influx de calcium par activation des canaux calciques de la membrane plasmique (2a) ou par libération du calcium des stocks intracellulaires (2b), provoquant l'activation du processus de phosphorylation/déphosphorylation calcium-dépendant (4). Il en résulte un changement de conformation de la cible (5) la rendant plus sensible à un insecticide donné (D). (D'après Licznar et al., 2014 et Apaire-Marchais et al., 2016). 31

Figure 16: Schéma résumant les processus de phosphorylation/déphosphorylation calcium-dépendants sur l'augmentation de l'efficacité d'un insecticide par changement de conformation de la cible. Les effets d'un insecticide donné (%) sont représentés par rapport aux logarithmes des concentrations croissantes d'insecticides, avant (A) et après le processus de phosphorylation/déphosphorylation calcium-dépendant (B, C). Les EC_{50} sont calculées à partir des courbes sigmoïdes correspondantes. Le processus de phosphorylation/déphosphorylation rend la cible membranaire plus sensible à un insecticide donné et la courbe effet log-concentration permet d'obtenir un EC_{50} plus faible, résultant d'un déplacement de la courbe sigmoïde vers des concentrations plus faibles (B). Cet effet peut être aussi associé à une augmentation de l'efficacité maximum de l'insecticide (C). 33

Figure 17: Effet de la deltaméthrine ($10^{-6}M$) sur la variation de la concentration en calcium intracellulaire provoquée par l'inversion de l'échange Na/Ca. $CdCl_2$: chlorure de cadmium (bloqueur des canaux calciques) ; TTX : Tétrodotoxine (inhibiteur des canaux sodium dépendants du potentiel) ; Kb-R7943 (inhibiteur de l'échange Na/Ca mode inverse). 36

Figure 18: Effet de l'association deltaméthrine avec le DCJW sur l'amplitude du courant entrant sodium sur neurone de blatte *Periplaneta americana*. Les données sont des valeurs moyennes + S.E.M. Analyse statistique ANOVA suivie d'un test Bonferroni (** $p < 0,01$, $n=6$). 37

Figure 19: Blatte *Periplaneta americana* en vue dorsale. A: mâle adulte, B: mâle, C: femelle. 38

Figure 20: Dilutions en cascade réalisées pour la préparation des solutions de deltaméthrine (DLT) (A) d'indoxacarbe (IND)(B) et de deltaméthrine nanoencapsulée (LNC-DLT)(C). 40

Figure 21: Protocole d'intoxication des blattes. 41

Figure 22: La mort de la blatte est estimée par pression sur l'abdomen. 42

Figure 23: Courbes effet log-concentration obtenues avec la deltaméthrine après intoxication des blattes *Periplaneta americana* à 24h, 48h et 72h. 44

Figure 24: Histogrammes comparatifs illustrant l'effet de l'indoxacarbe seul, et associé à la deltaméthrine utilisée à $10^{-5}M$ et $10^{-6}M$. Les données sont des valeurs moyennes + S.E.M. ns (non significatif) $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, ($n=4$ à 9). 45

Figure 25: Histogrammes comparatifs représentant le pourcentage de mortalité des blattes obtenu avec de la deltaméthrine $10^{-5}M$ seule et additionnée d'une dose subléthale de PBO

(50µg/blatte). Les données sont des valeurs moyennes + S.E.M. (n= 6-9). ns (non significatif) $p>0.05$; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ 46

Figure 26: Voies de disséminations et de dégradations des insecticides 47

Figure 27: Encapsulation des insecticides et impacts attendus, qui permettrait de réduire l'utilisation de insecticides conventionnels et garantir leur application en toute sécurité (Nuruzzaman et al., 2016)..... 50

Figure 28: Procédé de formulation des nanocapsules lipidiques chargées en deltaméthrine (LNC-DLT), adapté du procédé de formulation des nanocapsules lipidiques dites blanches (LNC) (Bastiat et al., 2012, 2013; Heurtault et al., 2002). 55

Figure 29: Protection enzymatique de la deltaméthrine par la nanoencapsulation. Evolution de la proportion (%) de deltaméthrine (DLT) en fonction du temps, encapsulée dans les LNCs (LNC-DLT)(■) ou en solution dans le mélange DMSO : eau dé-ionisée 1:49 (v/v) (●), en présence d'estérase (0,009 U.mL⁻¹) Concentration initiale en deltaméthrine : 95 µg.mL⁻¹. (n=3, moyenne ± écart-type). 61

Figure 30: Comparaison des courbes effet-log concentration entre le pourcentage de mortalité obtenu avec la deltaméthrine (gris) et la LNC-deltaméthrine (orange) mesuré à 24h, 48h et 72h. Les courbes représentent les meilleurs ajustements par rapport aux valeurs moyennes selon l'équation (2). Les données sont des valeurs moyennes + S.E.M. * $p<0,05$; *** $p<0,001$ (n=4-17)..... 64

Figure 31: Histogrammes comparatifs du pourcentage de mortalité obtenue en présence de de deltaméthrine et de deltaméthrine nanoencapsulée utilisée à 10⁻⁶M en fonction de différentes concentrations d'indoxacarbe (10⁻⁷M, 10⁻⁶M et 10⁻⁵M) à 24h, 48h et 72h. Les données sont des valeurs moyennes + S.E.M. ns (non significatif) $p>0.05$; * $p<0,05$; ** $p<0.01$, (n=5 à 10). Les taux de mortalité mesurés sans deltaméthrine sont indiqués sur le graphe à titre indicatif. 65

Figure 32: Histogrammes comparatifs du pourcentage de mortalité obtenu avec l'indoxacarbe seul 10⁻⁶M, la deltaméthrine 10⁻⁶M en présence de PBO et d'indoxacarbe 10⁻⁶M et la deltaméthrine nanoencapsulée 10⁻⁶M avec l'indoxacarbe 10⁻⁶M à 48h et 72h. Les données sont des valeurs moyennes + S.E.M. ** $p<0,01$ (n=4-10). Les taux de mortalité mesuré avec l'indoxacarbe 10⁻⁶M sont indiqués sur le graphe à titre indicatif. 67

Figure 33: Schéma hypothétique qui résume la stratégie proposée pour optimiser l'effet du DCJW et de l'indoxacarbe par la deltaméthrine utilisée comme agent synergisant. La modulation des canaux sodium dépendants du potentiel induite par la deltaméthrine nanoencapsulée (LNC-deltaméthrine) entraîne une augmentation de la concentration de sodium intracellulaire ainsi qu'une dépolarisation membranaire qui favorise l'influx de calcium via l'échange Na/Ca, mode inverse. L'élévation de la concentration de calcium intracellulaire augmente la sensibilité du canal sodium dépendant du potentiel pour de faibles concentrations de DCJW. La nanoencapsulation

protège la deltaméthrine d'une attaque enzymatique induite par les estérases, essentielles pour bio-activer l'indoxacarbe en DCJW..... 71

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales familles d'insecticides agissant sur des cibles de la membrane plasmique (modifié d'après Apaire-Marchais et al., 2016).....	16
Tableau 2: Récapitulatif des mutations <i>kdr</i> et <i>super kdr</i> chez les insectes ravageurs des cultures	27
Tableau 3: Caractéristiques des courbes dose-réponse obtenues avec la deltaméthrine après intoxication des blattes <i>Periplaneta americana</i>	43
Tableau 4: Distribution de taille (diamètre hydrodynamique (Z-Ave) et indice de polydispersité (PdI)) et efficacité d'encapsulation (EE) des LNC et LNC-DLT en suspension, avant et après purification par filtration ou centrifugation (n = 5 - 10, moyenne ± écart-type).	59
Tableau 5: Distribution de taille (diamètre hydrodynamique (Z-Ave) et indice de polydispersité (PdI)) des LNC-DLT en suspension, à différents pH et au cours du temps (n = 3, moyenne moyenne ± écart-type).	60
Tableau 6: Indice de combinaison des mélanges d'insecticides sur la blatte (<i>Periplaneta americana</i>), après 72h d'exposition	66

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., (2015) *The repellent DEET potentiates carbamate effects via insect muscarinic receptor interactions: an alternative strategy to control insect vector-borne diseases*. PloS one 10, e0126406.
- Adak, T., Kumar, J., Shakil, N.A., Walia, S. (2012) *Development of controlled release formulations of imidacloprid employing novel nano-ranged amphiphilic polymers*. J Environ Sci Health B. 47, 217–225.
- Annunziato, L., Pignataro, G., Renzo, G.F.D. (2004) *Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives*. Pharmacological reviews 56, 633–654.
- Ao, M., Zhu, Y., He, S., Li, D., Li, P., Li, J., Cao, Y. (2013) *Preparation and characterization of 1-naphthylacetic acid-silica conjugated nanospheres for enhancement of controlled-release performance*. Nanotechnology 24, 035601.
- Apaire-Marchais, V., Ogliastro, M., Chandre, F., Pennetier, C., Raymond, V., Lapied, B. (2016) *Virus and calcium: an unexpected tandem to optimize insecticide efficacy*. Environ Microbiol Rep. 8, 168–178.
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., Vontas, J. (2018) *Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance*. *Current Opinion in Insect Science, Pests and resistance*. Behavioural ecology 27, 68–74.
- Barros, A.T.M., Schumaker, T.T.S., Koller, W.W., Klafke, G.M., Albuquerque, T.A. de, Gonzalez, R. (2013) *Mechanisms of pyrethroid resistance in Haematobia irritans (Muscidae) from Mato Grosso do Sul state, Brazil*. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 22, 136–142.
- Bastiat, G., Hirsjärvi, S., Benoit, J.P. (2012) *Nanostructured Biomaterials for Overcoming Biological Barriers. Chapter 8.3: Drug Delivery Strategies: Lipid Nanocapsules*. pp. 483–497.
- Bastiat, G., Pritz, C.O., Roider, C., Fouchet, F., Lignières, E., Jesacher, A., Glueckert, R., Ritsch-Marte, M., Schrott-Fischer, A., Saulnier, P., Benoit, J.P. (2013) *A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: A real challenge for fluorescence imaging*. Journal of Controlled Release 170, 334–342.
- Bedos, C., Cellier, P., Calvet, R., Barriuso, E., (2002) *Occurrence of pesticides in the atmosphere in France*. Agronomie 22, 35–49.

- Benzidane, Y., Goven, D., Abd-Ella, A.A., Deshayes, C., Lapied, B., Raymond, V. (2017) *Subchronic exposure to sublethal dose of imidacloprid changes electrophysiological properties and expression pattern of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in insect neurosecretory cells*. Neurotoxicology 62, 239–247.
- Bodereau-Dubois, B., List, O., Calas-List, D., Marques, O., Communal, P.-Y., Thany, S.H., Lapied, B. (2012) *Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 341, 326–339.
- Calas-List, D., List, O., Quinchard, S., Thany, S.H. (2013) *Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of α -bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors*. Neurotoxicology 37, 127–133.
- Campos, E.V.R., Proença, P.L.F., Oliveira, J.L., Bakshi, M., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F. (2018) *Use of botanical insecticides for sustainable agriculture: Future perspectives*. Ecological Indicators.
- Carvalho, F.P. (2017) *Pesticides, environment, and food safety*. Food and Energy Security 6, 48–60.
- Casida, J.E. (2018) *Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators: Progress and Prospects*. Annu Rev Entomol. 63, 125–144.
- Casida, J.E. (2017) *Pesticide Interactions: Mechanisms, Benefits, and Risks*. J. Agric. Food Chem. 65, 4553–4561.
- Casida, J.E., Durkin, K.A. (2015) *Novel GABA receptor pesticide targets*. Pestic Biochem Physiol 121, 22–30.
- Casida, J.E., Durkin, K.A. (2013) *Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects*. Annu. Rev. Entomol. 58, 99–117.
- Chen, M., Du, Y., Nomura, Y., Zhu, G., Zhorov, B.S., Dong, K. (2017) *Mutations of two acidic residues at the cytoplasmic end of segment IIIS6 of an insect sodium channel have distinct effects on pyrethroid resistance*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 82, 1–10.
- Chen, X., Tie, M., Chen, A., Ma, K., Li, F., Liang, P., Liu, Y., Song, D., Gao, X. (2017) *Pyrethroid resistance associated with M918L mutation and detoxifying metabolism in *Aphis gossypii* from Bt cotton growing regions of China*. Pest Manag. Sci. 73, 2353–2359.
- Chou, T.C., Talalay, P. (1984) *Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors*. Adv. Enzyme Regul. 22, 27–55.
- Clemente, Z., Grillo, R., Jonsson, M., Santos, N.Z.P., Feitosa, L.O., Lima, R., Fraceto, L.F. (2014) *Ecotoxicological evaluation of poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules containing triazine herbicides*. J Nanosci Nanotechnol. 14, 4911–4917.

- Davies, T.G.E., Field, L.M., Usherwood, P.N.R., Williamson, M.S. (2007) *DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels*. IUBMB Life 59, 151–162.
- De, Arnab, Bose, R., Kumar, A., Mozumdar, S. (2014) *Targeted Delivery of Pesticides Using Biodegradable Polymeric Nanoparticles*. SpringerBriefs in Molecular Science. Springer India, New Delhi.
- Deshayes, C., Moreau, E., Pitti-Caballero, J., Froger, J.-A., Apaire-Marchais, V., Lapied, B. (2018) *Synergistic agent and intracellular calcium, a successful partnership in the optimization of insecticide efficacy*. Curr Opin Insect Sci. 30, 52–58.
- Deshayes, C., Siegwart, M., Pauron, D., Froger, J.-A., Apaire-Marchais, V., Lapied, B. (2017) *Microbial Pest Control Agents: Are they a Specific And Safe Tool for Insect Pest Management?*. Current Medicinal Chemistry.
- Dong, K. (2007) *Insect sodium channels and insecticide resistance*. Invert Neurosci. 7, 17–30.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K., Zhorov, B.S. (2014) *Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance*. Insect Biochem Mol Biol. 50, 1–17.
- Elliott, M. (1971). *The relationship between the structure and the activity of pyrethroids*. Bull World Health Organ 44, 313–324.
- Endersby, N.M., Viduka, K., Baxter, S.W., Saw, J., Heckel, D.G., McKechnie, S.W. (2011) *Widespread pyrethroid resistance in Australian diamondback moth, Plutella xylostella (L.), is related to multiple mutations in the para sodium channel gene*. Bull. Entomol. Res. 101, 393–405.
- Engel, P., Moran, N.A. (2013) *The gut microbiota of insects - diversity in structure and function*. FEMS Microbiol Rev. 37, 699–735.
- Field, L.M., Emyr Davies, T.G., O'Reilly, A.O., Williamson, M.S., Wallace, B.A. (2017) *Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides*. Eur Biophys J 46, 675–679.
- Flochlay-Sigognault, A., Guerino, F., Lapied, B. (2014) *Parasiticial combination comprising indoxacarb and deltamethrin*. Application number US20140170199A1.
- Franck, P., Siegwart, M., Olivares, J., Toubon, J.-F., Lavigne, C. (2012) *Multiple Origins of the Sodium Channel *kdr* Mutations in Codling Moth Populations*. PLOS ONE 7, e43543.
- Frederiksen, H.K., Kristensen, H.G., Pedersen, M. (2003) *Solid lipid microparticle formulations of the pyrethroid gamma-cyhalothrin-incompatibility of the lipid and the pyrethroid and biological properties of the formulations*. J Control Release 86, 243–252.
- Gammon, D.W., Brown, M.A., Casida, J.E. (1981) *Two classes of pyrethroid action in the cockroach*. Pesticide Biochemistry and Physiology 15, 181–191.

- Gómez-Guzmán, J.A., García-Marín, F.J., Sáinz-Pérez, M., González-Ruiz, R. (2017) *Behavioural Resistance in Insects: Its Potential Use as Bio Indicator of Organic Agriculture*. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 95, 042038.
- González-Cabrera, J., Rodríguez-Vargas, S., Davies, T.G.E., Field, L.M., Schmehl, D., Ellis, J.D., Krieger, K., Williamson, M.S. (2016) *Novel Mutations in the Voltage-Gated Sodium Channel of Pyrethroid-Resistant *Varroa destructor* Populations from the Southeastern USA*. PLoS ONE 11, e0155332.
- Goulu, M., Ataire-Marchais V., List O., Raymond V., Lapied B. (2017a) *Synergistic insecticidal composition comprising Thiamethoxam and insect repellents*. Application number 15306 929.9.
- Goulu, M., Ataire-Marchais V., List O., Raymond V., Lapied B. (2017b) *Insecticide composition including synergistic agent*, 8/06/2017 Application number 14/959,182.
- Grillo, Anderson, Pereira, Nishisaka, (2014) *Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control* - ScienceDirect.
- Haddi, K., Valbon, W.R., Jumbo, L.O.V., Oliveira, L.O. de, Guedes, R.N.C., Oliveira, E.E. (2018) *Diversity and convergence of mechanisms involved in pyrethroid resistance in the stored grain weevils, *Sitophilus spp.** Scientific Reports 8, 16361.
- Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D. (1995) *Exploring QSAR : hydrophobic, electronic, and steric constants*. American Chemical Society.
- Haubruge, É., Amichot, M. (1998) *Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens* 14. Biotechnol. Agron. Soc. Environ 2(3): 161-174.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.-E., Benoit, J.-P. (2002) *A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers*. Pharm Res 19, 875–880.
- Holyoke, C.W., Cordova, D., Zhang, W., Barry, J.D., Leighty, R.M., Dietrich, R.F., Rauh, J.J., Pahutski, T.F., Lahm, G.P., Tong, M.-H.T., Benner, E.A., Andreassi, J.L., Smith, R.M., Vincent, D.R., Christianson, L.A., Teixeira, L.A., Singh, V., Hughes, K.A. (2017) *Mesoionic insecticides: a novel class of insecticides that modulate nicotinic acetylcholine receptors*. Pest Management Science 73, 796–806.
- Huang, B., Chen, F., Shen, Y., Qian, K., Wang, Y., Sun, C., Zhao, X., Cui, B., Gao, F., Zeng, Z., Cui, H. (2018) *Advances in Targeted Pesticides with Environmentally Responsive Controlled Release by Nanotechnology*. Nanomaterials 8, 102.
- Ihara, M., Buckingham, S.D., Matsuda, K., Sattelle, D.B. (2017) *Modes of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors*. Curr. Med. Chem. 24, 2925–2934.

- Jiang, D., Du, Y., Nomura, Y., Wang, X., Wu, Y., Zhorov, B.S., Dong, K. (2015) *Mutations in the transmembrane helix S6 of domain IV confer cockroach sodium channel resistance to sodium channel blocker insecticides and local anesthetics*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 66, 88–95.
- Kah, M., Kookana R.S., Gogos A., Bucheli T.D. (2018) *A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues*. *Nat Nanotechnol.* 2018; 13 (8):677-684.
- Kah, M., Machinski, P., Koerner, P., Tiede, K., Grillo, R., Fraceto, L.F., Hofmann, T. (2014) *Analysing the fate of nanopesticides in soil and the applicability of regulatory protocols using a polymer-based nanoformulation of atrazine*. *Environ Sci Pollut Res Int* 21, 11699–11707.
- Kapantaidaki, D.E., Sadikoglou, E., Tsakireli, D., Kampanis, V., Stavrakaki, M., Schorn, C., Ilias, A., Riga, M., Tsiamis, G., Nauen, R., Skavdis, G., Vontas, J., Tsagkarakou, A. (2018) *Insecticide resistance in *Trialeurodes vaporariorum* populations and novel diagnostics for *kdr* mutations*. *Pest Manag. Sci.* 74, 59–69.
- Khan, H.A.A., Akram, W., Shad, S.A., Lee, J.-J. (2013) *Insecticide Mixtures Could Enhance the Toxicity of Insecticides in a Resistant Dairy Population of *Musca domestica* L.* *PLoS One* 8.
- Khin, M.M., Nair, A.S., Babu, V.J., Murugan, R., Ramakrishna, S. (2012) *A review on nanomaterials for environmental remediation*. *Energy Environ. Sci.* 5, 8075–8109.
- Khot, L.R., Sankaran, S., Maja, J.M., Ehsani, R., Schuster, E.W. (2012) *Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review*. *Crop Protection* 35, 64–70.
- Kumar, S., Bhanjana, G., Sharma, A., Sidhu, M.C., Dilbaghi, N. (2014) *Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles*. *Carbohydrate Polymers* 101, 1061–1067.
- Lambreva, M.D., Lavecchia, T., Tyystjärvi, E., Antal, T.K., Orlanducci, S., Margonelli, A., Rea, G., (2015) *Potential of carbon nanotubes in algal biotechnology*. *Photosyn. Res.* 125, 451–471.
- Lapied, B., Grolleau, F., Sattelle, D.B. (2001) *Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels*. *Br J Pharmacol* 132, 587–595.
- Lapied, B., Penetier, C., Apaire-Marchais, V., Licznar, P., Corbel, V. (2009) *Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization*. *Trends Biotechnol.* 27, 190–198.
- Lavialle-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, 264–272.

- Licznar, P., List, O., Goven, D., Nna, R.N., Lapied, B., Ataire-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, 72–75.
- Lim, C.J., Basri, M., Omar, D., Abdul Rahman, M.B., Salleh, A.B., Raja Abdul Rahman, R.N.Z. (2013) Green nanoemulsion-laden glyphosate isopropylamine formulation in suppressing creeping foxglove (*A. gangetica*), slender button weed (*D. ocimifolia*) and buffalo grass (*P. conjugatum*). Pest Manag. Sci. 69, 104–111.
- Liu, R., Lal, R. (2015) Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. Sci. Total Environ. 514, 131–139.
- Liu, Y., Tong, Z., Prud'homme, R.K. (2008) Stabilized polymeric nanoparticles for controlled and efficient release of bifenthrin. Pest Manag. Sci. 64, 808–812.
- Loha, K.M., Shakil, N.A., Kumar, J., Singh, M.K., Srivastava, C. (2012) Bio-efficacy evaluation of nanoformulations of β -cyfluthrin against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). J Environ Sci Health B 47, 687–691.
- Ma, X., Geisler-Lee, J., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Kolmakov, A. (2010) Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. Sci. Total Environ. 408, 3053–3061.
- MacBean, C., British Crop Protection Council (Eds.) (2009) *The pesticide manual: a world compendium, Fifteenth edition*. Ed. British Crop Protection Council, Alton, Hampshire.
- Mannai, S., Bitri, L., Thany, S.H. (2016) CGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway modulates nicotine-induced currents through the activation of α -bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptors from insect neurosecretory cells. J. Neurochem. 137, 931–938.
- Martin, Y.C. (1996) *Exploring QSAR: Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. C. Hansch, A. Leo, and D. Hoekman. American Chemical Society, Washington, DC. (1995) Xix + 348 pp. 22 × 28.5 cm. Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology. C. Hansch and A. Leo. American Chemical Society, Washington, DC. (1995) Xvii + 557 pp. 18.5 × 26 cm. ISBN 0-8412-2993-7. J Med Chem. 39, 1189–1190.
- Maruyama, C.R., Guilger, M., Pascoli, M., Bilesly-José, N., Abhilash, P.C., Fraceto, L.F., de Lima, R. (2016) Nanoparticles Based on Chitosan as Carriers for the Combined Herbicides Imazapic and Imazapyr. Sci Rep 6, 19768.
- McCann, S.F., Annis, G.D., Shapiro, R., Piotrowski, D.W., Lahm, G.P., Long, J.K., Lee, K.C., Hughes, M.M., Myers, B.J., Griswold, S.M. (2001) *The discovery of indoxacarb:*

oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides. Pest management science 57, 153–164.

- Melander, A.L. (1914) *Can Insects Become Resistant to Sprays?* J Econ Entomol 7, 167–173.
- Memarizadeh, N., Ghadamyari, M., Adeli, M., Talebi, K. (2014) *Preparation, characterization and efficiency of nanoencapsulated imidacloprid under laboratory conditions*. Ecotoxicol Environ Saf. 107, 77–83.
- Meredith, A.N., Harper, B., Harper, S.L. (2016) *The influence of size on the toxicity of an encapsulated pesticide: a comparison of micron- and nano-sized capsules*. Environment International 86, 68–74.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M. (2017) *Pesticides: an update of human exposure and toxicity*. Arch. Toxicol. 91, 549–599.
- Mulder, R., Gijswijt, M.J. (1973) *The laboratory evaluation of two promising new insecticides, which interfere with cuticle deposition*. Pesticide Science 4, 737–745.
- Murillo, L., Hamon, A., Es-Salah-Lamoureux, Z., Itier, V., Quinchard, S., Lapied, B. (2011) *Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells*. NeuroToxicology 32, 828–835.
- 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; 26.
- Nauen, R., Jeschke, P., Velten, R., Beck, M.E., Ebbinghaus-Kintscher, U., Thielert, W., Wölfel, K., Haas, M., Kunz, K., Raupach, G. (2015) *Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide*. Pest Management Science 71, 850–862.
- Nguyen, Hiep Minh, Hwang, I.-C., Park, J.-W., Park, H.-J. (2012) *Photoprotection for deltamethrin using chitosan-coated beeswax solid lipid nanoparticles*. Pest Manag Sci. 68, 1062–1068.
- Nguyen, M.-H., Hwang, I.-C., Park, H.-J. (2013) *Enhanced photoprotection for photolabile compounds using double-layer coated corn oil-nanoemulsions with chitosan and lignosulfonate*. J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 125, 194–201.
- Nikpour, F., Vatandoost, H., Hanafi-Bojd, A.A., Raeisi, A., Ranjbar, M., Enayati, A.A., Abai, M.R., Shayeghi, M., Mojahedi, A.R., Pourreza, A. (2017) *Evaluation of Deltamethrin in Combination of Piperonyl Butoxide (PBO) against Pyrethroid Resistant, Malaria Vector, Anopheles stephensi in IRS Implementation: an Experimental Semi-Filed Trial in Iran*. J Arthropod Borne Dis 11, 469–481.
- Nuruzzaman, M., Rahman, M.M., Liu, Y., Naidu, R. (2016) *Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application*. J Agric Food Chem. 64, 1447–1483.
- Ozoe, Y., Ozoe, F., Kita, T., Rahman, M.M., Liu, G., Hisano, K., Takashima, M., Nakata, Y. (2015) *Multiple Sites of Insecticidal Action in Iontropic GABA Receptors*, in: Discovery

and Synthesis of Crop Protection Products, ACS Symposium Series. American Chemical Society, pp. 431–446.

- Panini, M., Anaclerio, M., Puggioni, V., Stagnati, L., Nauen, R., Mazzoni, E. (2015) *Presence and impact of allelic variations of two alternative s-kdr mutations, M918T and M918L, in the voltage-gated sodium channel of the green peach aphid Myzus persicae*. *Pest Manag Sci*. 71, 878–884.
- Perry, T., Batterham, P., Daborn, P.J. (2011) *The biology of insecticidal activity and resistance*. *Insect Biochem Mol Biol*. 41, 411–422.
- Qian, K., Shi, T., He, S., Luo, L., Liu, X., Cao, Y. (2013) *Release kinetics of tebuconazole from porous hollow silica nanospheres prepared by miniemulsion method*. *Microporous and Mesoporous Materials* 169, 1–6.
- Raymond, V., Goven, D., Benzidane, Y., List, O., Lapied, B. (2017) *Influence of cellular and molecular factors on membrane target sensitivity to insecticides*. *Curr. Med. Chem*.
- Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B.M., Rauh, J.J., Sattelle, D.B. (2005) *Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides*. *Invert Neurosci* 5, 119–133.
- Rinkevich, F.D., Du, Y., Dong, K. (2013) *Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids*. *Pestic Biochem Physiol* 106, 93–100.
- Rinkevich, F.D., Su, C., Lazo, T.A., Hawthorne, D.J., Tingey, W.M., Naimov, S., Scott, J.G. (2012) *Multiple evolutionary origins of knockdown resistance (kdr) in pyrethroid-resistant Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata*. *Pestic Biochem Physiol* 104, 192–200.
- Saddiq, B., Ejaz, M., Shad, S.A., Aslam, M. (2017) *Assessing the combined toxicity of conventional and newer insecticides on the cotton mealybug Phenacoccus solenopsis*. *Ecotoxicology* 26, 1240–1249.
- Sarkar, D.J., Kumar, J., Shakil, N.A., Walia, S. (2012) *Release kinetics of controlled release formulations of thiamethoxam employing nano-ranged amphiphilic PEG and diacid based block polymers in soil*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 47, 1701–1712.
- Sarwar (2016) *Potential Uses of Synergists in Insecticides Resistance Management Accompanied by Their Contributions as Control Agents and Research Tools*. *Chemistry Research Journal*.
- Sekhon, B.S. (2014) *Nanotechnology in agri-food production: an overview*. *Nanotechnol Sci Appl* 7, 31–53.
- Shafer, T.J., Meyer, D.A., Crofton, K.M., (2005) *Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs*. *Environ Health Perspect* 113, 123–136

- Shang, Q., Shi, Y., Zhang, Y., Zheng, T., Shi, H. (2013) *Pesticide-conjugated polyacrylate nanoparticles: novel opportunities for improving the photostability of emamectin benzoate*. *Polymers for Advanced Technologies* 24, 137–143.
- Sharma, S., Kooner, R., Arora, R. (2017) *Insect Pests and Crop Losses*, in: Arora, R., Sandhu, S. (Eds.), *Breeding Insect Resistant Crops for Sustainable Agriculture*. Springer Singapore, Singapore, pp. 45–66.
- Silver, K., Dong, K., Zhorov, B.S. (2017) *Molecular Mechanism of Action and Selectivity of Sodium Channel Blocker Insecticides*. *Curr Med Chem.* 24, 2912–2924.
- Silver, K.S., Du, Y., Nomura, Y., Oliveira, E.E., Salgado, V.L., Zhorov, B.S., Dong, K. (2014) *Voltage-Gated Sodium Channels as Insecticide Targets*. *Adv In Insect Phys.* 46, 389–433.
- Soderlund, D.M. (2012) *Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances*. *Arch Toxicol.* 86, 165–181.
- Sogorb, M.A., Vilanova, E. (2002) *Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis*. *Toxicology Letters* 128, 215–228.
- Sparks, T.C., Nauen, R. (2015) *IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management*. *Insecticide and Acaricide Modes of Action and their Role in Resistance and its Management*. *Pestic Biochem Physiol.* 121, 122–128.
- Sparks, T.C., Watson, G.B., Loso, M.R., Geng, C., Babcock, J.M., Thomas, J.D. (2013) *Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: Chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects*. *Pestic Biochem Physiol.* 107, 1–7.
- Stankiewicz, M., Dąbrowski, M., de Lima, M.E. (2012) *Nervous System of Periplaneta americana Cockroach as a Model in Toxicological Studies: A Short Historical and Actual View*. *J Toxicol.*
- Thany, S.H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D.B., Lapied, B. (2007) *Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors*. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 14–22.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R., Polasky, S. (2002) *Agricultural sustainability and intensive production practices*. *Nature* 418, 671–677.
- van den Berg, F., Kubiak, R., Benjey, W.G., Majewski, M.S., Yates, S.R., Reeves, G.L., Smelt, J.H., van der Linden, A.M.A. (1999) *Emission of Pesticides into the Air*. *Water, Air, & Soil Pollution* 115, 195–218.
- Wang, X.-L., Su, W., Zhang, J.-H., Yang, Y.-H., Dong, K., Wu, Y.-D. (2016) *Two novel sodium channel mutations associated with resistance to indoxacarb and metaflumizone in the diamondback moth, Plutella xylostella*. *Insect Sci.* 23, 50–58.

- Whalon, M.E., Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R.M. (Eds.) (2008) *Global pesticide resistance in arthropods*. CABI, Wallingford.
- Wing, K.D., Sacher, M., Kagaya, Y., Tsurubuchi, Y., Mulderig, L., Connair, M., Schnee, M. (2000) *Bioactivation and mode of action of the oxadiazine indoxacarb in insects*. Crop Protection, XIVth International Plant Protection Congress 19, 537–545.
- Wing, K.D., Andaloro, J.T., McCann, S.F., Salgado, V.L. (2010) *Indoxacarb and the sodium channel blocker insecticides: chemistry, physiology, and biology in insects*. In: Gilbert, L.I., Gill, S.S., (Eds). *Insect Control: Biological and Synthetic Agents*. Elsevier, New York, pp.35-57.
- Wing, K.D., Schnee, M.E., Sacher, M., Connair, M. (1998) *A novel oxadiazine insecticide is bioactivated in lepidopteran larvae*. Arch Insect Biochem Physiol. 37, 91–103.
- Zhang, L., Lu, H., Guo, K., Yao, S., Cui, F. (2017) *Insecticide resistance status and detoxification enzymes of wheat aphids Sitobion avenae and Rhopalosiphum padi*. Sci China Life Sci. 60, 927–930.
- Zhao, X., Ikeda, T., Salgado, V.L., Yeh, J.Z., Narahashi, T. (2005) *Block of Two Subtypes of Sodium Channels in Cockroach Neurons by Indoxacarb Insecticides*. NeuroToxicology 26, 455–465.
- Zolnik, B.S., Sadrieh, N. (2009) *Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs*. Adv. Drug Deliv. Rev. 61, 422–427.

Sites internet:

- CNEV, (2014) *Utilisation des insecticides et gestion de la résistance*
https://www.anses.fr/fr/system/files/CNEVFtFev2014_Rapport_Utilisation_insecticides_gestion_resistance.pdf, consulté le 02/07/2018
- Copping, L.G. (2009) *European MEP Majority Supports Pesticide Legislation: Industry Looks Forward to More Science and Less Fiction During Implementation.*
<https://doi.org/10.1564/20feb03>, consulté le 24/01/2019
- Eurostat (2016) *Sales of pesticides in the EU.*
<https://ec.europa.eu/eurostat/fr/web/products-eurostat-news/-/DDN-20181015-1>, consulté le 24/06/2018
- IRAC, Insecticide Resistance Action Committee (2018).
<https://www.irac-online.org/>, consulté le 18/06/2018
- Plan Ecophyto I et II (2015).
<https://agriculture.gouv.fr/ecophyto>, consulté le 25/06/2017
- United Nations (2017) *World Population Prospects: The 2017 Revision, Key Findings and Advance Tables.* United Nations, Department of Economic and Social Affairs/Population Division.
https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/wpp2017_keyfindings.pdf, consulté le 01/04/2018

**L'auteur du présent document
vous
autorise à le partager,
reproduire,
distribuer et communiquer
selon
les conditions suivantes :**



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Annexe 1

Synergistic agent and intracellular calcium, a successful partnership in the optimization of insecticide efficacy

Caroline Deshayes, Eléonore Moreau, **Javier Pitti Caballero**, Josy- Anne Froger, Véronique Apaire-Marchais and Bruno Lapied.

Current Opinion in Insect Science, 30, 52-58 (2018).



Synergistic agent and intracellular calcium, a successful partnership in the optimization of insecticide efficacy

Caroline Deshayes, Eléonore Moreau, Javier Pitti-Caballero, Josy-Anne Froger, Véronique Apaire-Marchais and Bruno Lapied



Integrated Pest Management and Integrated Vector Management worldwide are developed in agriculture and public health to counteract and limit the exponential increasing development of insect resistance to insecticides. However, facing the predominance of some resistant populations, new strategies are urgently needed to target resistant insects. An innovative approach lies in the optimization of commonly used insecticides when combined with chemical or biological synergistic agents. By an increase of intracellular calcium concentration followed by activation of calcium-dependant signalling pathways, the synergistic agents are able to indirectly increase target sites sensitivity to insecticide by inducing conformational change. The synergistic agents are of great interest in optimizing the efficacy of insecticides and in overcoming resistance mechanisms.

Address

Laboratoire Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et Récepteurs (SiFCIR), UPRES-EA 2647, USC INRA 1330, SFR 4207 QUASAV, UFR Sciences, Université d'Angers, 2 Boulevard Lavoisier, F-49045 Angers Cedex, France

Corresponding author: Lapied, Bruno (bruno.lapied@univ-angers.fr)

Current Opinion in Insect Science 2018, 30:52–58

This review comes from a themed issue on Neuroscience

Edited by David Sattelle and Kazuhiko Matsuda

<https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.09.007>

2214-5745/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Neuroactive insecticides have been used widely over the five past decades for pest management and vector control. Since dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) was introduced in the 1940s, several classes of insecticides have been used like organophosphates, carbamates, phenylpyrazoles, pyrethroids, oxadiazines and neonicotinoids. These neuroactive chemicals have different modes of action depending on their targets in the nervous system [1–4]. Because of extensive, repeated use of these products, insects have developed a variety of mechanisms to

survive exposure to toxicants and resistant populations have emerged by selection pressure. Almost systematically, with every new insecticide development, cases of resistance appear 2–20 years later. Since the late 1940s, the number of species resistant to at least one insecticide and the number of insecticides for which at least one species has shown resistance have been continually increasing [5]. Resistance mechanisms can be grouped into four distinct categories: behavioral resistance, penetration resistance, overexpression of detoxification enzymes and target site mutations [2,6–8].

In agriculture, resistance has been reported for all insecticide classes for one or more key pest species like Lepidoptera or Hemiptera forcing the international community to develop Integrated Pest Management (IPM) to minimize the selection pressure that leads to resistance [9,10]. For this purpose, several strategies have been developed: first application of two or more insecticides alternating in turn, that is rotation, second high-dose/refuge strategy reducing the selection pressure on the population, third mixtures of insecticides and fourth hybrids strategies, such as the mosaic, which applies multiple insecticides to different areas, and in combination with other pest management tactics, such as biological and cultural controls [11].

Preventing or reducing insect vector-borne disease in a public health context needs strategic approach known as Integrated Vector Management (IVM). Rational decision-making process for the optimal use of insecticides is urgent. For example, malaria control programs are facing rapid widespread of insecticide resistance in the major anopheline vectors. The increasing resistance in *Anopheles* in the Afrotropical region is alarming. Between 2001 and 2012, there was a clear increase in prevalence and distribution of confirmed resistance of *Anopheles gambiae s.l.* to pyrethroids (from 41 to 87% of the mosquito populations tested) and DDT (from 64 to 91%) [12]. Resistance to pyrethroids [13] is of particular interest as they are the only insecticides used in insecticide-treated nets (ITNs) and are widely applied in indoor residual spraying (IRS) [14]. In response to this concern, the World Health Organization published the Global Plan for Insecticide Resistance Management (GPIRM) in 2012 [15]. Aiming to limit or delay the emergence of resistance by removing selection pressure, several approaches have been

developed including use of mixtures of insecticides, mosaic spraying, rotations of insecticides and deployment of multiple interventions in combination [16*]. Several mixtures, combining two or more insecticides with different modes of action, have been tested. Mixtures are most of the time a pyrethroid with another class of insecticides like carbamate, neonicotinoid or pyrrole [17–21]. However, cross-resistance needs to be considered when managing insecticide resistance through mixture approach [16*]. Novel strategies are urgently needed to efficiently target resistant insects such as for instance the development of new public health insecticides that engage a new target site [22]. However, discovering and developing a chemical compound that is patentable is usually a 'slow road' because development and registration requirements are complex, lengthy and extremely expensive.

Independent thereof, a very recent innovative approach is to use a synergistic agent able to produce intracellular calcium concentration changes, which activate calcium-dependent signalling pathway. In this context the synergistic agent (see Box 1) is not a synergist which is known to directly inhibit detoxification enzymes (e.g. PBO, DEF) [23]. The resulting activation of such signalling pathways increase sensitivity of membrane receptors and/or ion channels targeted by insecticides.

Orchestration of intracellular molecular events by calcium

Calcium ion is an ubiquitous key intracellular messenger involved in a variety of cell processes, particularly in neurons where calcium signals are fundamental for

exocytosis, apoptosis, neurotransmitter release and membrane excitability [24,25]. Calcium signalling is tightly regulated by transient increase in cytosolic calcium concentration with high versatility in terms of amplitude and spatiotemporal patterning within a neuron [26]. Under resting conditions, cytosolic calcium concentration is maintained at a very low concentration of 100 nM, which leads to a 10,000-fold calcium gradient across the plasma membrane as the extracellular calcium concentration is about 1–2 mM. Within the cells, calcium is stored in various organelles such as endoplasmic reticulum (ER) (0.3–0.7 mM), Golgi apparatus (0.13–0.25 mM), mitochondria, lysosome (0.4–0.6 mM) [27]. Upon stimulation, activation of calcium channels in plasma membrane or in organelles membranes leads to an elevation in the cytosolic calcium level by using both extracellular or intracellular calcium sources. In neurons, calcium influx through plasma membrane is accomplished by receptor-operated channels (ROCs) like N-methyl-D-aspartic acid receptors (NMDARs) or nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), voltage-operated channels (VOCs) and transient receptor potential type C channels (TRPC) [26,28–30]. Following the activation of PM-associated G protein coupled receptors (GPCRs) or receptor tyrosine kinases (RTKs), phospholipase C (PLC) is activated and hydrolyses phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) leading to generation of soluble inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG), the membrane-associated lipid messenger, which activates Protein kinase C (PKC), but also TRPC channels for instance [24,31]. IP3 induces mobilization of internal stores mediated by IP3 receptor (IP3R) present in ER and Golgi apparatus [25,26,32]. The participation of ryanodine receptor (RyR) also present in ER and Golgi apparatus plays an additional fundamental role in calcium mobilization [33]. In response to depletion of ER- Ca^{2+} stores, the store-operated calcium entry (SOCE) is activated [34,35]. The store-operated Ca^{2+} channels (SOCCs) play a homeostatic role in providing calcium to refill the ER. From a molecular point of view, the fall in ER calcium concentration leads to the dissociation of calcium from the ER-luminal N-terminus EF hand domain in stromal interaction molecule 1 (STIM1), a single-pass membrane protein in the ER acting as a sensor of calcium concentration. This dissociation leads to the unfolding of the STIM1 N-terminus, the multimerization of STIM1 proteins and their translocation by diffusion into ER-plasma membrane junctions. STIM1 multimers form large clusters, into which they recruit Orai1 tetramers, which are the functional unit of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels [35–37]. Activation of the CRAC channels induces a localized high calcium selective current called I_{CRAC} from the extracellular milieu. Orai1 can interact with TRPC channel subunits in a poorly understood manner to produce a moderately selective calcium current termed I_{SOC} [34,35]. To keep the intracellular calcium homeostasis and quickly return to baseline cytosolic

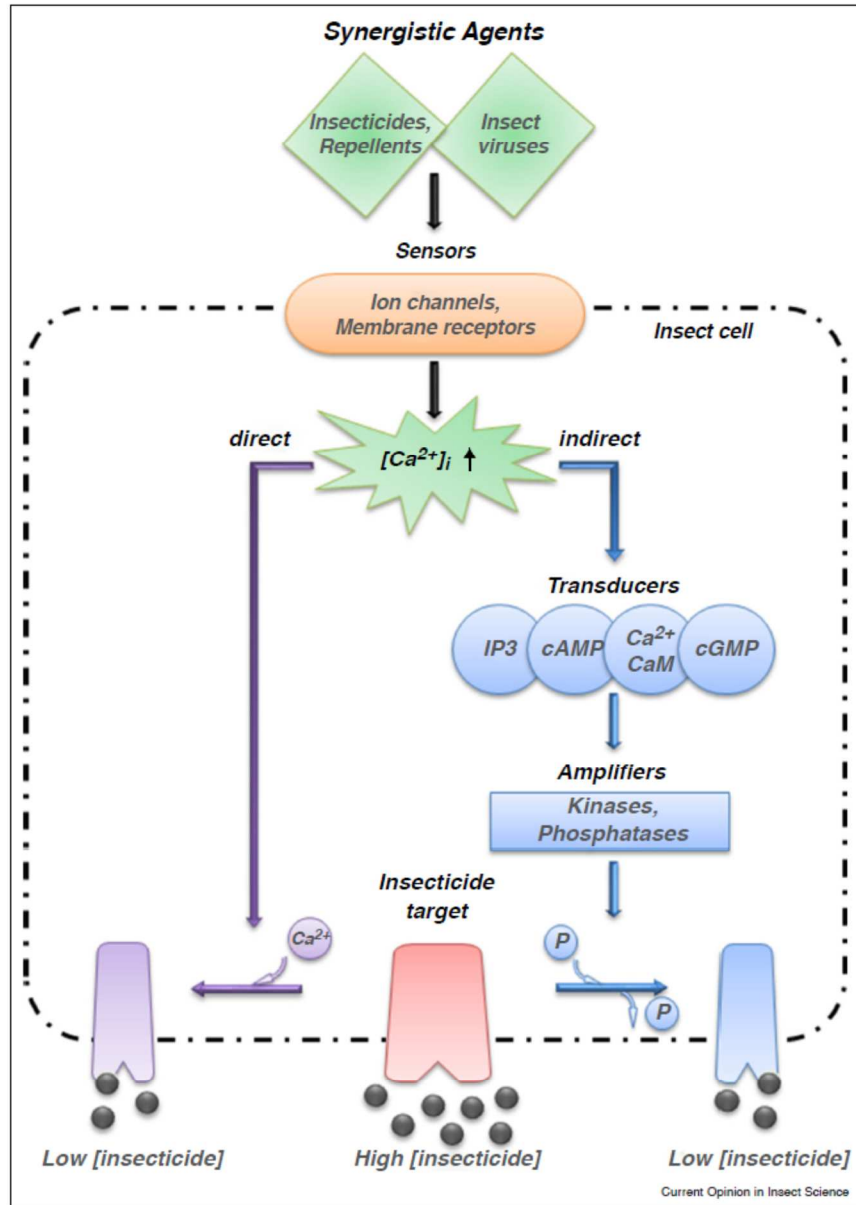
Box 1 Synergistic agent and optimization of the insecticide efficacy

In the context of pest and insect vector control, a synergistic agent is a chemical (insecticide, repellent . . .) and/or microorganism (insect viruses . . .) that indirectly enhances the effectiveness of several class of insecticides, although they usually have no effect or only a limited effect themselves.

At non-toxic concentrations, a synergistic agent acts by activating certain calcium-dependent intracellular signalling pathways naturally present in insects that are involved in the regulation of membrane ligand-gated receptor and ion channel functions targeted by insecticides. This is achieved by inducing an increase of intracellular calcium concentration through activation of specific membrane receptors within the insect, which thereby produce changes in receptor and ion channel conformational states, directly and/or indirectly through phosphorylation/dephosphorylation process leading to sensitization of the insect thus increasing the efficacy of the treatment.

In susceptible insects, synergistic agents combined with insecticides may provide enhancement whereas in resistant insects, synergistic agents can have a valuable contribution in significantly potentiating insecticide performance.

Figure 1



Example of signal transduction cascades triggered by chemical and biological synergistic agents. The binding of a given synergistic agent to ion channel and/or membrane receptor (Sensors) initiates calcium-dependent cascades of reactions inside the insect cell involving second messengers (Transducers), kinases and/or phosphatases (Amplifiers) through intracellular calcium concentration rise. This produces insecticide target conformational change, which thereby increases sensitivity to insecticides while reducing concentration.

calcium concentration, the calcium pumps located in the plasma membrane or organelles work in concert, either by extrusion of calcium to the extracellular environment or by its sequestration into the organelles lumen. The calcium is pumped back into the ER by the sarco-ER Ca^{2+} ATPase (SERCA) and into the Golgi apparatus by both SERCA and secretory pathway Ca^{2+} ATPase (SPCA) [24,25]. Other calcium channels or pumps are involved in calcium uptake into mitochondria or lysosomes like the mitochondrial calcium uniporter [24,27,29]. The calcium efflux from the cytosol to extracellular fluid is mediated by the plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA) and the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX).

Intracellular calcium as a key cellular messenger relay of the synergistic agent action

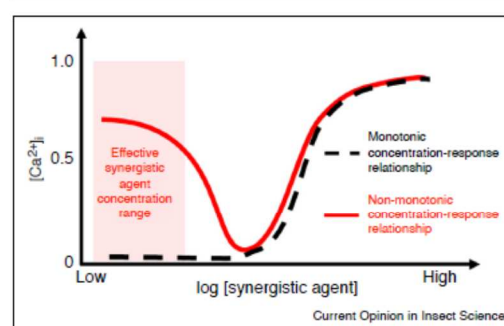
In our context, recent data have reported that elevation of the intracellular calcium concentration in insect neurons is known to be the first molecular event involved for increasing the sensitivity of target sites to insecticides (Figure 1) [21,38**]. Previous findings have indicated that both biological and chemical synergistic agents increase target site sensitivity to insecticides through intracellular calcium concentration changes. Among biological synergistic agent, insect viruses and particularly baculoviruses and densoviruses are suitable candidates to optimize insecticide action [39*]. Insect viruses present a low sanitary risk and are safe for people because they do not replicate in mammalian cells. In our context, insect viruses are not used as biopesticides [40] but only as biological agent able to rapidly activate calcium-dependent signalling pathways involved in the regulation of target site sensitive to insecticides. In fact, during virus infection, an increase of intracellular calcium concentration occurs through an increased membrane permeability to calcium and/or calcium released from internal stores [41,42]. Although few data have previously reported that insect virus can be co-applied with a chemical insecticide, insect viruses could be, nevertheless, considered as synergistic agent since previous data have indicated that the baculovirus *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* entry into the cell line Sf9 cells increases acetylcholinesterase sensitivity for the organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl through an elevation of intracellular calcium concentration [42]. This mechanism potentiates the insecticide efficiency, while reducing the concentration used.

Chemical synergistic agents are also important in playing a key role in the optimization of target site sensitivity to insecticides. Among them, the repellents (e.g. DEET, IR3535) are proposed to be used in this strategy. In this case, the synergistic effect is produced with combination of an insect repellent (used at subrepulsive concentration) and a given insecticide [21,38**]. In this case, repellent-induced calcium rise leads to direct (allosteric

modulation) and/or indirect sensitization of membrane targets through activation of kinases and phosphatases stimulated by elevation of the intracellular second messenger concentration (e.g. cAMP, cGMP, Ca-CaM, IP3), which is regulated by different enzyme activities such as PKA, PKC, PP1/2A, PP2B and CaM-Kinase II (Figure 1) [21,38**,43–46].

The resulting increased insecticide sensitivity produced by the elevation of the intracellular calcium concentration can be quantified by plotting the quantitative effect of a given insecticide on the membrane target versus the logarithm of the non-cumulative concentration of insecticide. But an important aspect to consider in this context is the shape of the concentration-response curve. In general, it is assumed that the concentration-response curve is monotonic. This means that the response increases or decreases with increasing concentration. However, it has also been proposed that non-monotonic concentration-response curves may also occur [47]. In this case, the concentration-response, changes direction. Among non-monotonic dose-response curve and in the context of a synergistic agent, this means that the slope of the curve changes direction within the range of tested concentrations. In other words, over part of the curve, response increases with concentration, while over another portion the response can increase as concentration decreases, displaying for instance an ‘U-shape curve’ (Figure 2). The conclusion would be that with decreasing concentrations, there is an increase of the response. This is particularly interesting since the strategy based on the use of a synergistic agent such as a repellent is only possible at subrepulsive concentrations of the insect repellent (i.e. very low concentration), which is nevertheless able to trigger a strong intracellular calcium rise, thereby activating a calcium-dependent signalling

Figure 2



Examples of monotonic and non-monotonic concentration-response curves. With synergistic agent, the illustrated U-shaped curve is considered as non-monotonic concentration-response relationship (red curve) because the slope of the curve changes sign one or more times within the range of the concentrations examined.

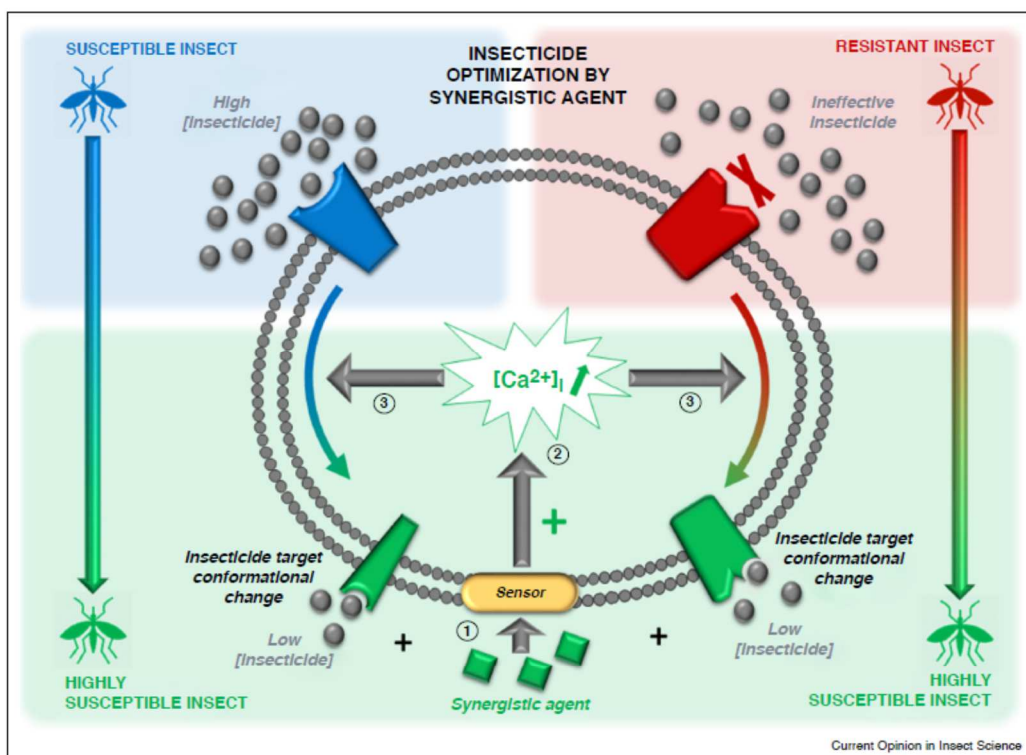
pathway involved in the optimization of the target sensitivity to insecticides.

Conclusions

The chemical-based insect pest or vector control is one of the most widespread used strategies. However, the development of resistance to insecticides, which are generally 'broad spectrum', (i.e. toxic action not limited only to the target species) can occur through a variety of mechanisms. In this context but not only, the synergistic agent-based strategy seems to promise a new approach to overcome insecticide resistance [48*]. When a synergistic agent joins, with an appropriate receptor, on the insect cell surface, this binding triggers a chain of calcium-dependant events that not only carries the signal to the cell interior, but amplifies it as well. These successive

activations also operate on the protein structure, inducing target site conformational changes closely related to an increase of target sensitivity to insecticide (Figure 3). These conformational changes can represent novel chemical entities in the membrane, which can be considered as key element with 'novel' specific recognition sites. In other words, the information carried in the modified protein conformation, which results in a novel spatial pattern of unmasked amino acids interacting sites, exposes unexpected molecular elements, which were not accessible to insecticides in the former protein conformational state (i.e. without the synergistic agent). Consequently, the synergistic agent-induced remodelling of the target site conformational ensemble may represent an exciting alternative way to counteract insect resistance observed with classical insecticides but also to optimize

Figure 3



Scheme of the strategy illustrating the optimization of the effect of insecticides by synergistic agents. Top blue and red boxes represent respectively susceptible and resistant insect populations. In susceptible insect, current insecticides are effective at relatively high concentration while they are ineffective in resistant populations due, for instance, to target site point mutations. In this innovative approach, the optimization of the insecticide action (bottom green box) involves the binding of the synergistic with specific membrane sensors (1) resulting in an increase of intracellular calcium concentration (2). The modulation of the calcium-dependent intracellular signalling pathways leads to insecticide target conformational change (3). This new conformation increases the target sensitivity to the insecticide, while reducing the concentration.

insecticide effects, while reducing concentration. The necessary molecular docking approach will be very helpful to model the interaction between the insecticide and the target site at the atomic level [38**]. This will allow better characterization of the behaviour of insecticides in these novel unmasked binding site of target proteins induced by synergistic agents by preferentially positioning these sites in a highly accessible region. The molecular docking process involving prediction of the insecticide conformation as well as its position and orientation within these revealed novel sites and assessment of the binding affinity will represent a fundamental approach in both IPM and IVM.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

Acknowledgement

This work was supported by the Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation (Anses) for the project VIRASI (N°2013-1-097).

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
 - of outstanding interest
1. Buckingham SD, Ihara M, Sattelle DB, Matsuda K: **Mechanisms of action, resistance and toxicity of insecticides targeting GABA receptors.** *Curr Med Chem* 2017, **24**:2935-2945.
 2. Casida JE, Durkin KA: **neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects.** *Annu Rev Entomol* 2013, **58**:99-117.
 3. Ihara M, Buckingham SD, Matsuda K, Sattelle DB: **Modes of action, resistance and toxicity of insecticides targeting nicotinic acetylcholine receptors.** *Curr Med Chem* 2017, **24**:2925-2934.
 4. Silver K, Dong K, Zhorov BS: **Molecular mechanism of action and selectivity of sodium channel blocker insecticides.** *Curr Med Chem* 2017, **24**:2912-2924.
 5. Sparks TC, Nauen R: **IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management.** *Pestic Biochem Physiol* 2015, **121**:122-128.
 6. Liu N: **Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions.** *Annu Rev Entomol* 2015, **60**:537-559.
 7. Zalucki MP, Furlong MJ: **Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence.** *Curr Opin Insect Sci* 2017, **21**:19-25.
 8. Silva AP, Santos JM, Martins AJ: **Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids - a review.** *Parasit Vectors* 2014, **7**:450.
 9. FAO: In *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides, Guidelines on Prevention and Management of Pesticide Resistance.* Edited by Office of Knowledge Exchange, Research and Extension. Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy; FAO; 2012.
 10. Khan MA, Khan Z, Ahmad W, Paul B, Paul S, Aggarwal C, Akhtar MS: **Insect Pest Resistance: An Alternative Approach for Crop Protection.** In *Crop Production and Global Environmental Issues.* Edited by Hakeem KR. Springer International Publishing; 2015:257-282.
 11. Sudo M, Takahashi D, Andow DA, Suzuki Y, Yamanaka T: **Optimal management strategy of insecticide resistance under various insect life histories: Heterogeneous timing of selection and interpatch dispersal.** *Evol Appl* 2017, **11**:271-283.
 12. Knox TB, Juma EO, Ochomo EO, Pates Jamet H, Ndungo L, Chege P, Bayoh NM, N'Guessan R, Christian RN, Hunt RH et al.: **An online tool for mapping insecticide resistance in major Anopheles vectors of human malaria parasites and review of resistance status for the Afrotropical region.** *Parasit Vectors* 2014, **7**:76.
 13. Du Y, Nomura Y, Zhorov BS, Dong K: **Sodium channel mutations and pyrethroid resistance in Aedes aegypti.** *Insects* 2016, **7**.
 14. Mnzava AP, Knox TB, Temu EA, Trett A, Fornadel C, Hemingway J, Renshaw M: **Implementation of the global plan for insecticide resistance management in malaria vectors: progress, challenges and the way forward.** *Malaria J* 2015, **14**:173.
 15. WHO: *Global Plan for Insecticide Resistance Management in Malaria Vectors.* Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2012.
 16. WHO: *Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010-2016.* Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2018.
- This global report represents an overview of information on worldwide resistance to four insecticide classes for malaria vectors between 2010 and 2016. This reports is based on the online *Malaria threats map* tool, which allows the interactive exploration of available information from the WHO insecticide resistance database and from other databases maintained by the Global Malaria Programme
17. Agossa FR, Padonou GG, Koukpo CZ, Zola-Sahossi J, Azondekon R, Akuoko OK, Ahoga J, N'dombidje B, Akinro B, Fassinou AJYH et al.: **Efficacy of a novel mode of action of an indoor residual spraying product, SumiShield® 50WG against susceptible and resistant populations of Anopheles gambiae (s.l.) in Benin, West Africa.** *Parasit Vectors* 2018, **11**:293.
 18. Bayili K, N'do S, Namountougou M, Sanou R, Ouattara A, Dabiré RK, Ouédraogo AG, Malone D, Diabaté A: **Evaluation of efficacy of Interceptor® G2, a long-lasting insecticide net coated with a mixture of chlorfenapyr and alpha-cypermethrin, against pyrethroid resistant Anopheles gambiae s.l. in Burkina Faso.** *Malaria J* 2017, **16**:190.
 19. Ngufor C, Fongnikin A, Rowland M, N'Guessan R: **Indoor residual spraying with a mixture of clothianidin (a neonicotinoid insecticide) and deltamethrin provides improved control and long residual activity against pyrethroid resistant Anopheles gambiae sl in Southern Benin.** *PLoS One* 2017, **12**:e0189575.
 20. Oxborough RM, N'Guessan R, Kitau J, Tongu PK, Malone D, Moshia FW, Rowland MW: **A new class of insecticide for malaria vector control: evaluation of mosquito nets treated singly with indoxacarb (oxadiazine) or with a pyrethroid mixture against Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus.** *Malaria J* 2015, **14**:353.
 21. Raymond V, Goven D, Benzidane Y, List O, Lapiéd B: **Influence of cellular and molecular factors on membrane target sensitivity to insecticides.** *Curr Med Chem* 2017, **24**:2974-2987.
 22. Carlier PF, Bloomquist JR, Totrov M, Li J: **Discovery of species-selective and resistance-breaking anticholinesterase insecticides for the malaria mosquito.** *Curr Med Chem* 2017, **24**:2946-2958.
 23. Sarwar M: **Potential uses of synergists in insecticides resistance management accompanied by their contributions as control agents and research tools.** *Chem Res J* 2016, **1**:21-26.
 24. Bollimuntha S, Pani B, Singh BB: **Neurological and motor disorders: neuronal store-operated Ca²⁺ signaling: an overview and its function.** *Adv Exp Med Biol* 2017, **993**:535-556.
 25. Britzolaki A, Saurine J, Flaherty E, Thelen C, Pitychoutis PM: **The SERCA2: a gatekeeper of neuronal calcium homeostasis in the brain.** *Cell Mol Neurobiol* 2018, **38**:981-994.
 26. Ryglewski S, Pflueger HJ, Duch C: **Expanding the neuron's calcium signaling repertoire: intracellular calcium release via**

- voltage-induced PLC and IP3R activation.** *PLoS Biol* 2007, **5**: e66.
27. Yang J, Zhao Z, Gu M, Feng X, Xu H: **Release and uptake mechanisms of vesicular Ca²⁺ stores.** *Protein Cell* 2018.
 28. Grienberger C, Konnerth A: **Imaging calcium in neurons.** *Neuron* 2012, **73**:862-885.
 29. Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E: **Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling.** In *Metalomics and the Cell*. Edited by Banci L. Netherlands: Springer; 2013:119-168.
 30. Chorna T, Hasan G: **The genetics of calcium signaling in *Drosophila melanogaster*.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1820**:1269-1282.
 31. Liao Y, Plummer NW, George MD, Abramowitz J, Zhu MX, Birnbaumer L: **A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC; Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:3202.
 32. Moccia F, Zuccolo E, Soda T, Tanzi F, Guerra G, Mapelli L, Lodola F, D'Angelo E: **Stim and Orai proteins in neuronal Ca²⁺ signaling and excitability.** *Front Cell Neurosci* 2015, **9**:153.
 33. Meissner G: **The structural basis of ryanodine receptor ion channel function.** *J Gen Physiol* 2017, **149**:1065-1089.
 34. Ambudkar IS, de Souza LB, Ong HL: **TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces.** *Cell Calcium* 2017, **63**:33-39.
 35. Putney JW: **Forms and functions of store-operated calcium entry mediators, STIM and Orai.** *Adv Biol Regul* 2018, **68**:88-96.
 36. Feske S, Skolnik EY, Prakriya M: **Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity.** *Nat Rev Immunol* 2012, **12**:532-547.
 37. Prakriya M, Lewis RS: **Store-operated calcium channels.** *Physiol Rev* 2015, **95**:1383-1436.
 38. Abd-Ella A, Stankiewicz M, Mikulska K, Nowak W, Pennetier C, Goulu M, Fruchart-Gaillard C, Licznar P, Apaire-Marchais V, List O **et al.: The repellent DEET potentiates carbamate effects via insect muscarinic receptor interactions: an alternative strategy to control insect vector-borne diseases.** *PLoS One* 2015, **10**:e0126406.
- This paper summarized all intracellular molecular events involved in the synergistic effect of the insect repellent DEET on the carbamate insecticide propoxur efficacy in insect neurons. DEET, at low concentrations, interacts with high affinity with a selective site in 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.
39. Apaire-Marchais V, Ogiastro M, Chandre F, Pennetier C, Raymond V, Lapied B: **Virus and calcium: an unexpected tandem to optimize insecticide efficacy.** *Environ Microbiol Rep* 2016, **8**:168-178.
- This publication presents important data relevant to the feasibility of combining an insect virus such as baculovirus or densovirus with an insecticide. In this case, the insect virus acts as a synergistic agent able to trigger calcium rise and to activate calcium-dependent intracellular signalling pathways involved in the increase of the membrane receptors and/or ion channels sensitivity to insecticides.
40. Deshayes C, Siegwart M, Pauron D, Froger JA, Lapied B, Apaire-Marchais V: **Microbial pest control agents: are they a specific and safe tool for insect pest management?** *Curr Med Chem* 2017, **24**:2959-2973.
 41. Cheshenko N, Trepanier JB, González PA, Eugenin EA, Jacobs WR, Herold BC: **Herpes simplex virus Type 2 glycoprotein H interacts with integrin $\alpha\beta 3$ to facilitate viral entry and calcium signaling in human genital tract epithelial cells.** *J Virol* 2014, **88**:10026-10038.
 42. Licznar P, List O, Goven D, Nna RN, Lapied B, Apaire-Marchais V: **A novel method using *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus for increasing the sensitivity of insecticide through calcium influx in insect cell line.** *J Virol Methods* 2014, **195**:72-75.
 43. Bodereau-Dubois B, List O, Calas-List D, Marques O, Communal PY, Thany SH, Lapied B: **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* 2012, **341**:326-339.
 44. Calas-List D, List O, Quinchard S, Thany SH: **Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of alpha-bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors.** *Neurotoxicology* 2013, **37**:127-133.
 45. Lavialle-Defaix C, Moignot B, Legros C, Lapied B: **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* 2010, **333**:264-272.
 46. List O, Calas-List D, Taillebois E, Juchaux M, Heuland E, Thany SH: **Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents.** *J Neurochem* 2014, **130**:507-513.
 47. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee D-H, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WW **et al.: Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses.** *Endocr Rev* 2012, **33**:378-455.
 48. Corbel V, Fonseca DM, Weetman D, Pinto J, Achee NL, Chandre F, Coulibaly MB, Dusfour I, Grieco J, Juntarajumnong W **et al.: International workshop on insecticide resistance in vectors of arboviruses, December 2016, Rio de Janeiro, Brazil.** *Parasit Vectors* (10):2017:278.
- This paper reports the main outputs of the first international workshop on Insecticide resistance in vectors of arboviruses held in Rio de Janeiro, Brazil, in 2016. This workshop has identified strategies for the development and implementation of standardized insecticide resistance management, and has also allowed comparisons between nations to define research priorities for control of vectors of arboviruses.

Annexe 2

Nanoencapsulated deltamethrin as synergistic agent potentiates insecticide effect of indoxacarb through an unusual neuronal calcium-dependent mechanism

Javier Pitti Caballero, Laurence Murillo, Olivier List, Guillaume Bastiat, Annie Flochlay-Sigognault, Frank Guerino, Corinne Lefrançois, Nolwenn Lautram, Bruno Lapied, Véronique Apaire-Marchais.

Pesticide Biochemistry and Physiology, (2019) accepté pour publication.

Nanoencapsulated deltamethrin as synergistic agent potentiates insecticide effect of indoxacarb through an unusual neuronal calcium-dependent mechanism

Javier Pitti Caballero^a, Laurence Murillo^b, Olivier List^a, Guillaume Bastiat^c, Annie Flochlay-Sigognault^d, Frank Guerino^d, Corinne Lefrançois^a, Nolwenn Lautram^c, Bruno Lapied^a, Véronique Apaire-Marchais^{a*}.

^aLaboratoire Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et des Récepteurs (SiFCIR), UPRES EA 2647, USC INRA 1330, SFR QUASAV 4207, UFR Sciences Université d'Angers, 2 boulevard Lavoisier, 49045 Angers, cedex, France.

^bLittoral ENvironnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266 CNRS-Université de La Rochelle, Institut du Littoral et de l'Environnement, 2 rue Olympe de Gouges, La Rochelle, France.

^cMicro et Nanomédecines Translationnelles, MINT, UNIV Angers, UMR INSERM 1066, UMR CNRS 6021, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France

^dMerck Animal Health, 2 Giralda Farms, Madison, NJ 07940-1026, USA

*Corresponding author: Laboratoire SiFCIR, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, 49045 Angers, cedex, France ; E-mail adress : veronique.marchais@univ-angers.fr

Keywords : synergistic agent; nanoencapsulation; deltamethrin; indoxacarb; insect neurons

Abstract

The use of neurotoxic chemical insecticides has led to consequences against the environment, insect resistances and side-effects on non-target organisms. In this context, we developed a novel strategy to optimize insecticide efficacy while reducing doses. It is based on nanoencapsulation of a pyrethroid insecticide, deltamethrin, used as synergistic agent, combined with a non-encapsulated oxadiazine (indoxacarb). In this case, the synergistic agent is used to increase insecticide efficacy by activation of calcium-dependant intracellular signaling pathways involved in the regulation of the membrane target of insecticides. In contrast to permethrin (pyrethroid type I), we report that deltamethrin (pyrethroid type II) produces an increase in intracellular calcium concentration in insect neurons through the reverse Na/Ca exchanger. The resulting intracellular calcium rise rendered voltage-gated sodium channels more sensitive to lower concentration of the indoxacarb metabolite DCJW. Based on these findings, *in vivo* studies were performed on the cockroach *Periplaneta americana* and mortality rates were measured at 24h, 48h and 72h after treatments. Comparative studies of the toxicity between indoxacarb alone and indoxacarb combined with deltamethrin or nanoencapsulated deltamethrin (LNC-deltamethrin), indicated that LNC-deltamethrin potentiated the effect of indoxacarb. We also demonstrated that nanoencapsulation protected deltamethrin from esterase-induced enzymatic degradation and led to optimize indoxacarb efficacy while reducing doses. Moreover, our results clearly showed the benefit of using LNC-deltamethrin rather than piperonyl butoxide and deltamethrin in combination commonly used in formulation. This innovative

strategy offers promise for increasing insecticide efficacy while reducing both doses and side effects on non-target organisms.

1. Introduction

Agrochemicals such as neurotoxic insecticides are widely used to improve crop yield and to assure efficient control of insect pests. However, although chemical insecticides are a powerful tool to control insect pests, neurological side-effects and resistance may develop. In the last case, if the same chemical class is used repeatedly and/or if compounds have the same mode of action on targets. This can facilitate cross resistance [1, 2]. Consequently, insecticide resistance management represents a global challenge. Among strategies available, the discovery of new insecticides is always considered as a possible alternative. However, it is a long and expensive process. Usually 9 to 10 years will elapse from discovery to first registration and after registration; the market life for different insecticides varies greatly. In view of these above problems, it is crucial to develop novel strategies based, for example, on the better use of the current insecticides to enhance their efficacy [3]. Different strategies can be proposed including (i) the application of different insecticide combinations acting on different targets (i.e. pyrethroids with other compounds) [4-8] and (ii) the optimization of the effect of insecticides by synergists such as piperonyl butoxide (PBO) and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF) [8-11]. In this case, the mode of action of the majority of synergists is to block the metabolic systems that would otherwise break down insecticide molecules. They interfere with the detoxification of insecticides through their action on enzyme systems involved in the insecticides degradation (e. g., esterases, cytochrome p450

monooxygenases, hydrolases, glutathion S-transferases). However, these strategies do not allow a significant reduction of the active ingredient concentration used. The novel approach we can propose is to use either chemical or biological synergistic agents with a given insecticide in combination to optimize insecticide efficacy while reducing doses of the treatment [7, 12].

Synergistic agents can be defined as a chemical or biological compound used to enhance the effectiveness of an insecticide although they usually have no or limited effect themselves. At a non-toxic concentration, the synergistic agent is able to activate calcium-dependent intracellular signaling pathways involved in increasing the sensitivity of membrane receptors or ion channels to insecticides. It can thereby produce changes in target conformational states through phosphorylation or dephosphorylation processes [7, 12, 13]. Initial search for patterns of conserved amino acid residues that have been associated with phosphorylation sites in, for instance, voltage-gated sodium channels, GABA receptors and in nicotinic acetylcholine receptor subunits showed that they possess potential phosphorylation sites for protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC) and protein kinase G (PKG) and for calcium/calmodulin-dependent serine/threonine-protein kinase (CaM-kinase) [7, 14-17]. This is important because it has been demonstrated in insect neurons that intracellular calcium rise modulates, through activation of these molecular events involved in the calcium-dependent signaling pathways, the functional properties of these membrane targets, which thereby increase their sensitivities to insecticides [7, 18-20].

Based on these data, we used deltamethrin as synergistic agent combined to indoxacarb and its activated metabolite DCJW. Deltamethrin is well known to affect voltage-gated sodium channels by i) prolonging the course of the sodium current during depolarization, ii) developing slow tail current and iii) inducing a use-dependent block of the action potential coupled with the depolarization of the resting membrane potential [2]. By contrast indoxacarb/DCJW are sodium channel blocker insecticides known to block neuronal action potentials in both insect central and peripheral nervous systems. DCJW, is significantly more potent than indoxacarb as an inhibitor of voltage-gated sodium channels in causing hyperpolarizing shifts in the voltage dependence of inactivation (combination of slow and fast inactivation) resulting in the inhibition of the sodium current. Consequently, the aim of our investigation was (i) to demonstrate *in vitro* that deltamethrin can be used as synergistic agent by potentiating the effect of the indoxacarb metabolite DCJW *via* an increase of the intracellular calcium concentration in cockroach neurosecretory cells identified as Dorsal Unpaired Median (DUM) neurons and (ii) to evaluate *in vivo* the synergistic effect of the mixture deltamethrin / indoxacarb by intoxication of the cockroach *Periplaneta americana*. Furthermore, because nanoencapsulation procedures have shown promising results to increase stability and bioavailability of the active ingredient [21], deltamethrin was nanoencapsulated to demonstrate if the synergism observed between deltamethrin and indoxacarb can be optimized. In this study, we reveal that reversal of the plasma membrane Na/Ca exchanger contributes to the immediate rise in intracellular calcium concentration resulting from voltage-

gated sodium channel modulation induced by deltamethrin. This elevation of intracellular calcium concentration renders the sodium channels more sensitive to DCJW. Based on these *in vitro* studies, we have also develop a novel strategy using deltamethrin-loaded lipid nanocapsules (LNC-deltamethrin) to perform *in vivo* toxicological studies with LNC-deltamethrin / indoxacarb in combination in order to increase indoxacarb efficacy while reducing its concentrations and negative impact on the environment.

2. Materials and methods

2.1. In vitro studies

2.1.1. Biological model

All experiments were performed on adult male cockroaches *Periplaneta americana* taken from our laboratory stock colony and reared under standard conditions (29°C, photocycle of 12h light / 12h dark). Animal care and handling procedures were in accordance with French institutional and national health guidelines.

2.1.2. Insecticides and pharmacological products

Permethrin was provided by Intervet Productions s.a., (Igoville, France). Deltamethrin was purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Stock solutions of both components (10^{-2} M) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich), and stored at -20°C. Subsequent dilutions of deltamethrin (10^{-4} M to 10^{-7} M) were prepared in sucrose (Sigma-Aldrich) syrup 100 mg mL⁻¹. For *in vivo* studies, the highest concentration of

DMSO used for toxicity experiments was 0.1%. For *in vitro*, the concentration of solvent (0.1%) was found to be without effect on the electrical activity of DUM neurons.

Indoxacarb (Avaunt® 15% Emulsion Concentrate (EC)) was supplied by DuPont™ and diluted (1/28) in sucrose syrup 100 mg mL⁻¹ to obtain a stock solution at 10⁻²M. Subsequent dilutions of indoxacarb (10⁻³M to 10⁻⁷M) were prepared in sucrose syrup 100 mg mL⁻¹ for the cockroach exposure experiments. The indoxacarb metabolite decarbomethoxylated JW062 (DCJW) was provided by DuPont Crop Protection Stine Haskell Research Center Newark, USA. Stock solution (10 mM) was prepared in DMSO.

Piperonyl butoxide (PBO) (Sigma-Aldrich) which is a well-known inhibitor of cytochrome-P450 monooxygenases was prepared in DMSO to obtain a stock solution at 500 µg/mL.

2.1.3. Cell preparation

Experiments were carried out on DUM neuron somata isolated from the midline of the terminal abdominal ganglion (TAG) of the nerve chord of adult male cockroaches (*Periplaneta americana*). 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 200 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 5 mM CaCl₂, 4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 50 mM sucrose, pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Isolation of adult DUM neuron somata was performed under sterile conditions using enzymatic treatment and mechanical

dissociation of the median part of the TAG, as previously described [22]. DUM neuron somata were maintained at 29°C for 24h before electrophysiological experiments were carried out.

2.1.4. Whole-Cell Recordings

The whole-cell patch-clamp recording configuration was used to record voltage-dependent inward sodium currents (voltage-clamp mode) at room temperature (20–22°C). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC 150T-10; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) with a PP83 puller (Narishige, Tokyo, Japan). Pipettes had a resistance ranging from 0.9 to 1.1 MΩ when filled with internal solution containing 90 mM CsCl, 70 mM CsF, 15 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM ATP-Mg, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH was adjusted to 7.4 with CsOH. The superfusing solution contained 100 mM NaCl, 100 mM Tetraethylammonium-chloride (TEA-Cl), 3.1 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂, 0.5 mM CdCl₂, 3 mM 4-aminopyridine (4-AP), 10 mM HEPES, pH was adjusted to 7.4 with TEA-OH. Both superfusing solution and internal pipette solution used to record inward sodium currents were designed to eliminate any interference from calcium and potassium currents as already described elsewhere [23, 24].

The liquid junction potential between bath and internal solution was always corrected before the formation of a gigaohm seal (>2 GΩ). Voltage-dependent sodium currents were recorded with an Axopatch 200A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) amplifier, filtered at 5 kHz using a 4-pole low-pass Bessel filter. Series resistance value was obtained for each experiment from the

patch-clamp amplifier settings after compensation and varied between 1.5 and 3 M Ω . Step voltage pulses were generated by a programmable stimulator (SMP 310; Biologic, Claix, France) or an IBM computer with software control pClamp 8.0.3 connected to a 125-kHz labmaster DMA data acquisition system (TL-1; Axon Instruments). The pClamp package (version 8.0.3) was used for data acquisition and analysis. DUM neuron cell bodies were voltage-clamped at a steady-state holding potential of -90 mV, and 30-ms test pulses (except when otherwise stated) were applied at a frequency of 0.1 Hz. Although leak and capacitive currents were compensated electronically at the beginning of each experiment, subtraction of residual capacitive and leakage currents was performed with an online P/6 protocol provided by pClamp. All compounds were purchased from Sigma Aldrich.

2.1.5. Calcium imaging

For calcium imaging experiments, DUM neuron cell bodies were isolated from the TAG of adult male cockroaches, as already described above. The cells were washed two times in saline and incubated in the dark with 5 mM Fura-2 pentakis (acetoxymethyl) ester (Fura-2 AM) (Sigma-Aldrich) in the presence of 0.1% pluronic acid F68 (Sigma-Aldrich) for 1 h at 37°C. After loading, cells were washed two times in saline. The glass coverslips were then mounted in a recording chamber (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) connected to a gravity perfusion system allowing drug application. Imaging experiments were performed with an inverted Nikon Eclipse Ti microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with epifluorescence. Excitation light was provided by a 75-W integral

xenon lamp. Excitation wavelengths (340 nm and 380 nm) were applied using a Lambda DG4 wavelength switcher (Sutter instrument, Novato, CA, USA). Images were collected with an Orca-R2 CCD camera (Hamamatsu photonics, Shizuoka, Japan) and recorded on the computer with Imaging Workbench software (version 6, Indec BioSystems, Santa Clara, CA, USA). Experiments were carried out at room temperature. Intracellular calcium level was expressed as the ratio of emitted fluorescence (340/380 nm).

2.1.6. Statistical analysis

For statistical analysis, normal distribution (or Gaussian distribution) of the data was tested using Kolmogorov–Smirnov at a significance of $p < 0.05$ [25] and R software (R version 2.9.0 Software). Because Gaussian distributions of data were obtained, the one way ANOVA had to be used (parametric statistical method) followed by the *post-hoc* Bonferroni's test. Significant differences were considered for $p < 0.05$.

2.2. Formulation of lipid nanocapsules, deltamethrin-loaded lipid nanocapsules and their characterization

2.2.1. Preparation of lipid nanocapsules and deltamethrin-loaded lipid nanocapsules

Non-loaded and deltamethrin-loaded lipid nanocapsules (LNC and LNC-deltamethrin, respectively) formulation processes were based on an already reported phase-inversion method [26-28]. Briefly, 846 mg of Kolliphor[®] HS 15 (non-ionic surfactant, a mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) (provided by BASF, Ludwigshafen, Germany); 75

mg of Lipoid® 75-3 (soybean lecithin at a 69% concentration of phosphatidylcholine) (supplied by Lipoïd GmbH, Ludwigshafen, Germany); 1028 mg of Labrafac® WL 1349 (capric/caprylic acid triglyceride) (provided by Gattefossé S.A., Saint-Priest, France); 89 mg of NaCl (purchased from Prolabo, Fontenay-Sous-Bois, France); and 2962 mg of de-ionised water (from a Milli® Q system, Millipore, Billerica, MA, USA) were precisely weighed. Under continuous agitation (magnetic stirring), the mixture was heated up to 95°C and cooled down to 60°C three times. During the last temperature decrease step, at around 75°C, 5 mL of de-ionized cold water (at 4°C) were quickly added, leading to the suspension of LNC. For LNC-deltamethrin, deltamethrin was first dissolved in Labrafac® WL 1349 at a concentration of 0.1% (w/w), before adding the other constituents and to proceed to the formulation process. LNC and LNC-deltamethrin suspensions were stored at 4°C.

2.2.2. Size distribution of lipid nanocapsules and deltamethrin-loaded lipid nanocapsules

The size distribution, *i.e.* hydrodynamic diameter (Z-ave) and polydispersity index (Pdl), of both LNC and LNC-deltamethrin was measured using a Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, UK). The quasi-elastic light scattering instrument is equipped with a 4mW Helium–Neon laser, with an output wavelength of 633 nm, and a scatter angle fixed at 173°. The correlation functions were fitted using an exponential fit (Cumulant approach) for Z-ave and Pdl determinations. All measurements were performed at 25°C on LNC suspensions diluted in de-ionized water by a factor of 60 (v/v).

2.2.3. Deltamethrin encapsulation efficiency and analysis method

Two basic purification processes of LNC-deltamethrin suspension were used: centrifugation (10,000 g during 10 min) and filtration (0.22 μm), to remove free solid micro-aggregates of deltamethrin in aqueous suspension. The deltamethrin encapsulation rate in LNC was determined before and after the purification processes.

Fifty μL of non-purified or purified LNC-deltamethrin were mixed with 950 μL of methanol. The mixtures were vigorously vortexed to dissolve the LNCs, destroying their structure and allowing to the release of deltamethrin, soluble in methanol. These solutions were filtered (0.22 μm) before the titration of deltamethrin, performed using an UPLC system (Waters, France). A C18 analytical column (ACQUITY UPLC[®] BEH C18 1.7 μm 2.1 x 50 mm, Waters, France) was used at 40°C. The mobile phase consisted of Acetonitrile:Water mixture. A succession of gradient and isocratic programs was applied: gradient from 0.7:0.3 to 1:0 (v/v) between 0 and 1 min; isocratic 1:0 (v/v) until 2 min; gradient from 1:0 to 0.7:0.3 (v/v) between 2 and 3 min; and isocratic 0.7:0.3 (v/v) until 5 min. The flow rate was 0.4 mL/min, the injection volume was 5 μL and deltamethrin was quantified (retention time: 1.65 min) by an UV detector at $\lambda = 266$ nm. The calibration curve was established by quantifying the area under the curves (AUCs) of deltamethrin solutions (50 μL of LNC suspension and 950 μL of deltamethrin in methanol) with final deltamethrin concentration range from 0 to 5 $\mu\text{g/mL}$.

The encapsulation efficiencies (EE) of deltamethrin (DLT) in LNCs, before and after the purification processes, were calculated using the following equation:

$$EE(\%) = \frac{\text{Experimental DLT amount in LNCs} \times 100}{\text{Theoretical DLT amount in LNCs}} \quad (1)$$

2.2.4. Enzymatic protection

One mL of LNC-deltamethrin suspension was mixed with 50 μL of esterase in water (Esterase from porcine liver, Sigma-Aldrich, France) (pH = 8.3). In addition, 20 μL of deltamethrin in DMSO was mixed with 980 μL of water and 50 μL of esterase in water (pH = 8.3). Deltamethrin concentration was 95 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and esterase concentration was 0.52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.009 U/mL). Under magnetic stirring at room temperature, 50 μL of the each mixture were sampled at 5 min, 30 min, 1h, 1h30, 2h, 3h, 4h, 6h and 24h, and completed with 950 μL of methanol. Deltamethrin was quantified using UPLC method (See section 2.2.3).

2.3. In vivo studies: exposure to insecticides

2.3.1 Intoxication protocol

In vivo studies were performed using between 4 and 17 experimental groups of 10 adult cockroaches per concentration of insecticide. Before starting the experiments, cockroaches were deprived of access to water for 48 hours in order that they may drink the whole insecticide supplied. The different concentrations of insecticides were administered by ingesting (orally intoxication). Thus 10 μL of insecticide or 20 μL of the mixture of insecticides (i.e., 10 μL synergistic agent and 10 μL insecticide) were deposited on parafilm M[®] and absorbed by each cockroach. After insecticide treatment, cockroaches

were put back in their vivarium. Control experiments were performed under the same experimental conditions without insecticide and with LNCs. Parallel experiments were performed with PBO used at a maximal sublethal dose (50µg/cockroach). PBO was added to deltamethrin alone or to deltamethrin in combination with indoxacarb.

Mortality rate was assessed 24h, 48h and 72h after the treatment. The mortality criteria were based on the daily observation of the appearance of cockroaches. Cockroaches affected by insecticide were considered “dead” when they turn and do not present any type of movement of their extremities. Mortality of the cockroaches was observed pressing on the abdomen for one minute and the death is recorded in absence of movement.

2.3.2. Data analysis

To estimate the EC₅₀ values of the curve fitting, data were analyzed with the GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The Hill equation used to fit the sigmoid curve was:

$$Y = Bottom + \frac{(Top - Bottom)}{1 + 10^{(LogEC_{50} - X) \cdot HillSlope}} \quad (2)$$

where Top and Bottom are plateaux in the units of the Y axis, EC₅₀ is the concentration that gives halfway between Bottom and Top. HillSlope describes the steepness of the curve. All statistical analysis were performed with Mann-Whitney test (non-parametric statistical method) (using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Significant differences were considered for p<0.05.

The combination index (CI) method [29] was used to evaluate possible synergistic interaction between deltamethrin / indoxacarb and LNC-deltamethrin / indoxacarb. To assess synergisms, antagonism and/or additive effect, the combination index was determined by using the following equation:

$$CI_x = \frac{LC_x^{1m}}{LC_x^1} + \frac{LC_x^{2m}}{LC_x^2} + \left(\frac{LC_x^{1m}}{LC_x^1} \times \frac{LC_x^{2m}}{LC_x^2} \right) \quad (3)$$

Where the values in the numerator of the equation are the lethal concentrations (LC) of insecticides 1 and 2 in mixture giving x mortality. LC_x^1 and LC_x^2 are the lethal concentrations of insecticides 1 and 2 respectively, producing the same mortality x when used alone. The resultant values of CI were scaled to categorize the mixture effect: additive effect when $CI = 1$, antagonist effect when $CI > 1$ and synergistic effect when $CI < 1$. These values were calculated at 20% mortality level.

3. Results

3.1. Differential effects of two pyrethroids, deltamethrin and permethrin on isolated DUM neuron cell body intracellular calcium concentration.

The first set of experiments was designed to investigate the effect of deltamethrin (Fig. 1A) on $[Ca^{2+}]_i$. Bath application of 10^{-6} M deltamethrin on Fura-2 loaded DUM neuron cell body produced a marked elevation in $[Ca^{2+}]_i$ followed by a sustained elevated level (Fig. 2Aa). Maximum calcium rise occurred approximately 450s upon application of the insecticide (Fig. 2B). It is interesting that similar experiments performed in cell bodies pretreated with permethrin (10^{-6} M) (Fig. 1B) did not produce elevation of $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 2Ab, B). We next examined the source of the intracellular calcium rise observed with deltamethrin.

When the experiments were conducted in the presence of the well-known inorganic calcium channel blocker CdCl_2 ($5 \cdot 10^{-4}\text{M}$), the elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by deltamethrin was not affected (Fig. 3Aa, Ba). By contrast, external application of the sodium channel blocker TTX (10^{-7}M) completely suppressed the intracellular calcium rise triggered by deltamethrin (Fig. 3Aa, Bb). Careful observation of the calcium response produced by 10^{-6}M deltamethrin revealed that the time course $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise differed according to the cell region (Fig. 3B). As indicated in Fig. 3B, illustrating the three-dimensional cytofluorescence intensity plot, the elevation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was first detected at the cell body periphery whereas in the middle part of the cell there was no fluorescence detected. Because bath application of CdCl_2 failed to reduce the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by deltamethrin (Fig. 3Ba) whereas TTX completely abolished intracellular calcium rise (Fig. 3Bb), it seemed that the deltamethrin-induced increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ involved an unexpected membrane mechanism. It is known that deltamethrin, a type II pyrethroid, causes membrane depolarization accompanied by suppression of the action potential [30]. However, the expected participation of voltage-gated calcium channels activated by membrane depolarization and suspected to be involved in calcium influx into the cell body was eliminated since the calcium channel blocker CdCl_2 did not reduce $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise produced by deltamethrin (Fig. 3Aa,b). In addition, because pyrethroids cause prolonged opening of voltage-gated sodium channels, by inhibiting deactivation and stabilizing the open state, it is tempting to suggest that deltamethrin could produce an increase in intracellular sodium concentration through its effect on voltage-gated sodium channels (see Fig. 3Aa, Bb), which

thereby could activate the reverse mode of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCXrev) exchanger to uptake calcium. In other words, deltamethrin, *via* the reverse NCX mode, could induce a net calcium gain coupled to the extrusion of sodium. To substantiate this hypothesis, Kb-R7943, the well-known inhibitor of the NCXrev was tested. As shown in Fig. 3Ab, Bc, the enhancement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in response to deltamethrin was completely abolished after $5 \cdot 10^{-6}\text{M}$ Kb-R7943 pretreatment.

3.2. Synergism between deltamethrin and DCJW occurs through $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise in DUM neurons

Previous findings performed on isolated DUM neuron cell bodies indicated that DCJW, the decarbomethoxylated metabolite of the oxadiazine insecticide indoxacarb (Fig. 1C), blocks voltage-dependent sodium channels [31]. In addition, under the same experimental conditions, we demonstrated that calcium-dependent intracellular regulation of voltage-gated sodium current increases the sensitivity to DCJW [19]. Based on these results, we were interested in studying the putative synergistic effect of pyrethroids, deltamethrin and permethrin on the blocking action of DCJW using the patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration under voltage-clamp mode. According to results presented in Fig. 2 and to ensure that permethrin was ineffective to produce synergistic effect, a higher concentration of permethrin was tested. As illustrated in Fig. 4A, bath application of permethrin (10^{-5}M) and DCJW (10^{-7}M) applied in combination on DUM neurons pretreated with permethrin (10^{-5}M) did not produce any significant increase of the DCJW-induced blocking effect of the voltage-dependent sodium current amplitude

elicited by a 30-ms depolarizing pulse to 0 mV from a holding potential of -90 mV, compared to those obtained with the insecticides applied alone ($F(2,16)=1.8$, $p=0.19$). By contrast, co-application of deltamethrin ($3 \cdot 10^{-6}\text{M}$) with DJCW (10^{-7}M) on DUM neurons pretreated with deltamethrin ($3 \cdot 10^{-6}\text{M}$) resulted in an important synergistic effect of DCJW on the voltage-dependent sodium current amplitude (Fig. 4B) ($F(2,14)=16.5$, $p=0.0002$). To express more quantitatively the synergism of between deltamethrin and DCJW, isolated DUM neurons were exposed to various concentrations of DCJW. The semi-logarithmic concentration-response curve for the blockade of sodium current obtained after 20 minutes of treatment with DCJW (10^{-7}M) used alone and combined with deltamethrin (concentration range from 10^{-7}M to 10^{-5}M) to determine the minimum concentration of deltamethrin necessary to obtain the maximum potentiation of DCJW effect. As illustrated in Fig. 4C, the minimum deltamethrin concentration needed to strongly increase the effect of DCJW (used at 10^{-7}M) was determined to be $3 \cdot 10^{-6}\text{M}$. In other words, when the minimum deltamethrin concentration was used (*i.e.*, $3 \cdot 10^{-6}\text{M}$), the maximum effect of DCJW was obtained for a concentration more than 10-fold lower (arrow in Fig. 4C).

3.3. Determination of the lowest concentration of deltamethrin used as synergistic agent in cockroaches *Periplaneta americana*

Based on the results obtained *in vitro*, presented just above and to investigate *in vivo* the expected synergism between these two compounds, we first examined the effect of deltamethrin alone in adult cockroaches *Periplaneta*

americana. A second set of experiments was performed with indoxacarb tested alone and combined with deltamethrin. Indoxacarb, *in vivo*, is bioactivated by the cleaving of a carbomethoxy group from the parent compound, occurring through the action of esterase and/or amidase enzymes. In this case, the released N-decarbomethoxylated metabolite DCJW produces toxic effects *via* an inhibition of voltage-gated sodium channels [32].

In order to determine the lowest concentration of deltamethrin producing mortality of adults *Periplaneta americana*, the average mortality rate percentages were plotted against the logarithm of the non-cumulative concentrations of deltamethrin, at 24h, 48h and 72h after receiving deltamethrin (Fig. 5A,B,C). In each case, the sigmoid curve corresponded to the best fit (Table 1) according to the Hill equation (2). The EC₅₀ estimated for deltamethrin (i.e., the concentration of deltamethrin that produces 50% mortality) at 24h, 48h and 72h were presented in Table 1. The threshold concentration inducing mortality was 10⁻⁵M at 24h, 48h and 72h. The slopes were equally reproducible for 24h and 48h whereas the slope of the curve measured at 72h was initially not as steep as 24h and 48h (Table 1). This suggested that at 72h, the effect of increasing deltamethrin concentration was relatively minimal, whereas the steeper slopes measured at 24h and 48h suggested that maximum efficacy was obtained in a narrow range of concentrations of deltamethrin. In addition, the maximum effect reached changed *versus* time of exposure from 58±12% at 24h (n=17) to 91±7% (n=18) and 98±3 (n=11) at 48h and 72h, respectively. The following sequence of efficacy was 24h<48h<72h (Fig. 5A,B,C). Then, we were interested in performing comparative studies of the toxicity induced by

deltamethrin and indoxacarb, used alone and in combination. Adult male cockroaches *Periplaneta americana* were fed individually with different concentrations of indoxacarb (from 10^{-7} M to 10^{-5} M) tested alone and with deltamethrin (10^{-6} M and 10^{-5} M) in combination. The two concentrations of deltamethrin were chosen according to the results illustrated in Fig. 2A and 5A,B,C. A group bar chart was used at 24h, 48h and 72h to compare data : deltamethrin (10^{-5} M) / indoxacarb mixtures vs indoxacarb alone, and deltamethrin (10^{-6} M) / indoxacarb mixtures vs indoxacarb alone (Fig. 5D,E,F). While no difference was observed after 24h exposure (Fig. 5D), the percentage of mortality rates were significantly increased with deltamethrin (10^{-6} M) / indoxacarb (10^{-5} M) mixture at 48h ($U(8,8)=13.0$, $p=0.0324$; Fig. 5E) and statistically more potentiated with deltamethrin (10^{-6} M) / indoxacarb (10^{-5} M) mixture at 72h ($U(8,8)=8.0$, $p=0.0078$; Fig. 5F), compared to indoxacarb used alone.

3.4. Comparative studies of the toxicity between deltamethrin and nanoencapsulated-deltamethrin

It is well known that among detoxification enzymes, esterases and cytochrome P450s are responsible for deltamethrin metabolism. However, in our context, deltamethrin is proposed to be used as synergistic agent capable of optimizing indoxacarb efficacy through intracellular calcium rise. Consequently, to avoid rapid metabolization of deltamethrin by a hydrolytic cleavage of the ester bond followed by oxidation yielding the non-active acid metabolites, additional set of experiments were designed to comparatively evaluate mortality rates of

deltamethrin used alone, deltamethrin in combination with PBO and nanoencapsulated deltamethrin (Fig. 6A). Since PBO shows a role in blocking enzymes involved in detoxifying deltamethrin, mortality rates measured at 24h, 48h and 72h after 10^{-5} M deltamethrin + PBO mixture were expected to increase. As illustrated in the Fig. 6A, the comparative histograms representing mortality rates *versus* time of exposure indicated that the combination of 10^{-5} M deltamethrin with PBO was more effective in mortality rate of cockroaches than deltamethrin alone ($U(9,17)= 24.0$, $p=0.0017$; $U(9,17)=9.0$, $p=0.0001$; and $U(4,9)=1.0$, $p=0.0104$ at 24h, 48h and 72h, respectively). These results indicated that the presence of synergist has led to a decrease in detoxification therefore resulting in higher mortality rate from the beginning of treatment (*i.e.*, 24h) and after 48h and 72h, in comparison with absence of PBO.

We then performed additional experiments to propose that nanoencapsulated deltamethrin helped in delivering higher impact on cockroaches than deltamethrin + PBO mixture. Deltamethrin was encapsulated in lipid nanocapsules (LNC-deltamethrin) using a phase inversion process, already described in the literature [26-28]. Deltamethrin was solubilized in the triglyceride core of the LNCs. After the formulation process, the size of LNCs ($Z\text{-Ave}$) was measured at 57 ± 3 nm ($n=6$), with a monomodal and monodisperse size distribution: $PdI = 0.07 \pm 0.01$ ($n=6$). In addition, a total deltamethrin encapsulation rate was estimated, using UPLC for the non-purified formulation and calculated according to equation (1), at 99 ± 3 % ($n = 3$), but also the purified ones: filtration over $0.22 \mu\text{m}$ estimated at 104 ± 1 % ($n = 3$), or centrifugation at 10,000 g during 10 min at 103 ± 2 % ($n = 3$). It should be noted

that the size distributions of the LNC-deltamethrin were not modified after purification. To investigate the potential higher toxicity of nanoencapsulated deltamethrin in cockroaches, the effects of deltamethrin alone and LNC-deltamethrin were compared (Fig. 6). Cockroaches were fed orally with 10 μ L of deltamethrin and others with 10 μ L of LNC-deltamethrin. Deltamethrin concentrations ranging from 10^{-7} M to 10^{-4} M were tested and mortality rates were evaluated at 24h, 48h and 72h after treatment. As shown in Fig. 6B,C,D, the data for deltamethrin alone were compared with the concentration-dependent actions of LNC-deltamethrin. The concentration-response curves established for LNC-deltamethrin and corresponded to the best fit according to the Hill equation (2) were fundamentally different from those obtained with deltamethrin alone in term of potency, maximal efficacy and slope at 24h, 48h and 72h. In each case, the threshold concentration at which toxicity first appeared was lower than that of evaluated with deltamethrin alone. Moreover, from that point, the curve increased with higher concentration levels with substantial changes in the shape and slope of the sigmoid curves. The corresponding EC_{50} estimated at 24, 48 and 72 hours were lower (*i.e.*, $1.7 \cdot 10^{-5}$ M, $2 \cdot 10^{-5}$ M and $7 \cdot 10^{-6}$ M, respectively) than those obtained with deltamethrin alone (Table 1). The relatively flat concentration-response curves observed with LNC-deltamethrin (Hill slopes were 1.9, 1.1 and 0.9 at 24h, 48h and 72h, respectively) compared to the Hill slope values determined with deltamethrin (Table 1), indicated important changes in the percentage of the mortality rates obtained when the concentration increased. Although LNC-deltamethrin produced weak toxicity at 24h, these results demonstrated that LNC-deltamethrin had stronger toxicity

than deltamethrin alone at 48h and 72h (e.g., $U(6,17)=4.5$, $p=0.0006$; and $U(4,5)=0.0$, $p=0.0189$ for $10^{-5}M$ for 48h and 72h, respectively). In fact this increased toxicity produced by LNC-deltamethrin formulation could be related to its slow releasing properties with enhanced permeability and/or stability. These properties could be mainly achieved through either protecting the nanoencapsulated active deltamethrin from premature degradation and/or metabolization or increasing efficacy for a longer period (see Fig. 6C,D). This last point being fundamental since deltamethrin was expected to play a key role as synergistic agent to produce intracellular calcium rise necessary to optimize indoxacarb efficacy on voltage-gated sodium channels through esterase-induced bioactivation to its more active metabolite DCJW.

3.5. Comparative studies of the toxicity of deltamethrin / indoxacarb and LNC-deltamethrin / indoxacarb mixtures.

The following experiments were designed to investigate the efficacy of LNC-deltamethrin / indoxacarb mixture. Fig. 7 shows mortality rates of cockroaches exposed to indoxacarb tested alone at different concentrations (from $10^{-7}M$ to $10^{-5}M$), deltamethrin ($10^{-6}M$) + indoxacarb and LNC-deltamethrin ($10^{-6}M$) + indoxacarb at 24h, 48h and 72h. At 24h, mortality rate was not significantly higher with both mixtures compared to indoxacarb alone (Fig. 7A). At 48h, mortality rate reached $24\pm 10\%$ ($U(9,10)=9.5$, $p=0.0039$) with LNC-deltamethrin ($10^{-6}M$) + indoxacarb ($10^{-6}M$) mixture (Fig. 7B). The treatment with this mixture consistently and significantly achieved the highest level of mortality at 72h with indoxacarb used at $10^{-6}M$ ($40\pm 14\%$, $U(9,10)=12.5$, $p=0.0084$), compared to

indoxacarb alone or in combination with deltamethrin (Fig. 7C). It is interesting to mention that prolonged exposition to deltamethrin (10^{-6}M) / indoxacarb (10^{-6}M) mixture than 72h (*i.e.*, 96h) did not produce any statistically significant higher mortality ($U(10,10)=38,5$, $p=0.38$) ($11\pm 9\%$ ($n=10$), $15\pm 9\%$ ($n=10$) for 72h and 96h, respectively). To express more quantitatively the synergistic effect of LNC-deltamethrin on indoxacarb toxic activity, equation (3) was used to determine the combination index (see Materials and Methods section). As indicated in Table 2, the combined effect of LNC-deltamethrin (10^{-6}M) / indoxacarb (10^{-6}M) was greater than that predicted by their individual potencies and induced higher mortality than the mixture deltamethrin (10^{-6}M) / indoxacarb (10^{-6}M). For LNC-deltamethrin (10^{-6}M) / indoxacarb (10^{-6}M) combination, the combination index (CI) appeared 2.9-fold lower than that of deltamethrin (10^{-6}M) / indoxacarb (10^{-6}M). These results indicated that important synergistic interactions occurred between LNC-deltamethrin (10^{-6}M) and indoxacarb (10^{-6}M).

3.6. Benefits of nanoencapsulation for the deltamethrin-induced synergistic effect

The aim of the following experiments was to study *in vitro* (i) the contribution of esterases to deltamethrin degradation and (ii) how nanoencapsulation could help to protect deltamethrin against enzymatic degradation. Fig. 8A shows the percentage of deltamethrin detected in solution, plotted versus time. In this case, 99% of deltamethrin nanoencapsulated was detected in solution after 24h of esterase treatment whereas only 40% of deltamethrin alone was found.

These results clearly demonstrated the preservation effect of nanoencapsulation from enzymatic action.

In addition, the benefits of LNC-deltamethrin (10^{-6}M) / indoxacarb (10^{-6}M) in combination was evaluated, *in vivo*, in comparison to deltamethrin (10^{-6}M) / PBO / indoxacarb (10^{-6}M) mixture after 48h and 72h treatment (Fig. 8B). At both 48h and 72h, mortality rates were significantly higher with the mixture LNC-deltamethrin (10^{-6}M) / indoxacarb (10^{-6}M) ($U(10,10)=9.5$, $p=0.0019$; and $U(9,10)=13.5$, $p=0.0093$ at 48h and 72h, respectively) compared to deltamethrin (10^{-6}M) / PBO / indoxacarb (10^{-6}M) in combination (Fig. 8B). These results provided an *in vivo* proof-of-concept for using LNC-deltamethrin rather than PBO to optimize the effect of indoxacarb.

4. Discussion

4.1. Deltamethrin increases intracellular calcium concentration through the activation of reverse Na/Ca exchange

Whereas there are similarities in the voltage-gated sodium channel modification induced by type I and type II pyrethroids, marked differences are nevertheless observed between the two types in terms of distinct intoxication syndromes, of the kinetics of the sodium current modulation [16, 33, 34] and intracellular calcium concentration changes (this study). The findings described here show that deltamethrin, a type II pyrethroid, elevates intracellular calcium concentration in isolated DUM neurons, whereas the type I pyrethroid, permethrin does not produce any intracellular calcium rise. Our study further shows that, to the contrary of permethrin, the deltamethrin-induced intracellular

calcium concentration elevation facilitates higher sensitivity of voltage-gated sodium channel to DCJW. This confirms previous findings that revealed the potentiation of the effect of DCJW on sodium channels through the activation of the calcium-dependent signaling pathways (e.g., CaM-kinase II pathway) resulting from intracellular calcium rise [19]. One of the most interesting feature is the mechanism by which deltamethrin elevates intracellular calcium concentration. To our knowledge, this is the first example reporting the participation of the neuronal reverse Na/Ca exchanger in intracellular calcium changes produced by deltamethrin. The Na/Ca exchanger regulates intracellular concentration of calcium and sodium ions in the vertebrate as well as invertebrate nervous system in a relevant physiological mechanism that maintains cellular homeostasis [35, 36]. The Na/Ca exchange acts as a bidirectional transporter. When operating in the forward mode, it plays a key role in lowering intracellular calcium concentration by electrogenically exchanging one cytosolic calcium for three external sodium. The Na/Ca exchange can also function in a reverse mode causing calcium influx by exchanging extracellular calcium for intracellular sodium. Conditions that favour reverse Na/Ca exchange include positive membrane potential and increased intracellular sodium. Deltamethrin as type II pyrethroid, causes membrane depolarization and prolonged opening of voltage-gated sodium channels primarily by modifying deactivation and stabilizing the open state [16, 34, 37]. In this case, the deltamethrin-induced tail-currents associated with repolarization under voltage-clamp conditions reflect the prolonged opening of pyrethroid-modified sodium channels. The decay of tail current induced by deltamethrin is much slower than

that of induced by type I pyrethroid [34]. In other words, deltamethrin inhibits the deactivation of sodium channels to a greater extent than, for instance permethrin, the type I pyrethroid. This quantitative difference in tail current decay kinetics between permethrin and deltamethrin could account for their different action on isolated DUM neuron intracellular calcium concentration. Furthermore, deltamethrin requires repeated depolarizations to induce detectable tail currents. In our case, isolated DUM neurons, known to generate beating pacemaker sodium-dependent action potentials [38] are, consequently, very sensitive to deltamethrin, which will preferably bind to the activated (*i.e.*, open) state of sodium channels (Fig. 9A, step 1). All together, these effects of deltamethrin cause a large increase in intracellular sodium concentration. When cytosolic sodium is elevated, the Na/Ca exchange can switch from forward to reverse mode bringing external calcium into the DUM neuron (Fig. 9A, step 2). This is confirmed by KB-R7943, known to be a selective inhibitor of the Na/Ca exchanger operating in the reverse mode [39, 40], which blocks the deltamethrin-induced elevation of calcium concentration. The intracellular calcium rise (Fig. 9A, step 3) potentiates the inhibitory effect of DCJW, obtained at lower concentration, on insect sodium channels (Fig. 9A, step 4), as previously reported [19].

4.2. Deltamethrin used as synergistic agent to optimize the efficacy of DCJW and indoxacarb

Based on the results described above, the synergistic effect observed *in vitro* in the presence of mixture of deltamethrin / DCJW compared to DCJW applied

alone highlights the participation of intracellular calcium concentration elevation, triggered by deltamethrin, in the increase of sodium channel sensitivity to insecticide. The deltamethrin / DCJW mixture synergistic effect reflects that the reduction of the DUM neuron inward sodium current amplitude observed with DCJW alone is strongly potentiated when deltamethrin is co-applied with DCJW [41]. This makes deltamethrin a suitable candidate to be used as synergistic agent able to produce intracellular calcium concentration changes, which increase sensitivity of membrane sodium channels targeted by insecticides, as already reported for other synergistic agent / insecticide used in combination [7, 42].

Therefore, we have also investigated *in vivo* the interaction between deltamethrin and indoxacarb (the pro-insecticide that undergoes bioactivation in insects to the metabolite, DCJW) [32, 43] by co-applying deltamethrin in the presence of increased concentration of indoxacarb *versus* time of exposure (24, 48 and 72h). The results obtained, which correlate well with the *in vitro* studies, indicate that the interaction between deltamethrin and indoxacarb is synergistic (e.g., at 72h), resulting in a significant increase of the mortality rate of *Periplaneta americana*. According to these ensemble outcomes, it is tempting to postulate that deltamethrin-induced intracellular calcium rise occurring, *via* the mechanism described above (Fig. 9A,B, steps 1-4), may serve as an additional calcium-dependent effector to optimize the effect of DCJW, produced *in vivo*, which will thereby increase the synergism between deltamethrin and indoxacarb.

4.3. Nanoencapsulation of deltamethrin improves the synergism between deltamethrin and indoxacarb

More importantly, we have developed nanocapsules carrying deltamethrin system as a promising strategy to optimize indoxacarb efficacy while shortening time of exposure and reducing concentration of insecticides. Today, the potential use of nanoencapsulated insecticides and benefits are important and well known [21, 44]. Therefore, nanoencapsulation would provide efficient alternatives for the management used in agriculture and for the reduction of neurotoxic adverse effects on non-target animals. In our study, we propose the use of a new type of formulation including the nanoencapsulation of the synergistic agent (*i.e.*, deltamethrin) combined with the non-nanencapsulated insecticide, indoxacarb. One of the more important problems with pyrethroids and particularly deltamethrin is that insects may detoxify or destroy the pyrethroid by the over-production of detoxifying enzymes (*e.g.*, esterases) [45]. In this case, the pyrethroid-hydrolyzing esterase is able to catalyze the hydrolysis of deltamethrin in nontoxic and/or non-active compound. To counteract this problem, the development of nanoencapsulated deltamethrin (Fig. 9B) protects the synergistic agent from premature esterase degradation, as it has been demonstrated in our study, *in vitro*. This formulation could help to obtain a slow release of deltamethrin, used as synergistic agent, essential to trigger intracellular calcium rise involved in the potentiation of the effect of indoxacarb (bioactivated in DCJW), on voltage-gated sodium channels (Fig. 9B, step 5a). We also report that nanoencapsulation of the synergistic agent seems to provide an important technology in insecticide formulation compared with

conventional insecticide formulation that include synergists such as PBO. Indeed comparative studies of mortality rate performed with deltamethrin combined with PBO and nanoencapsulated deltamethrin clearly reveal, in the last case, higher potentiation of indoxacarb efficiency. Furthermore, another advantage of the slow release of nanoencapsulated deltamethrin is that indoxacarb, which is only weakly active against insect voltage-gated sodium channels needs to be N-decarbomethoxylated to DCJW, a metabolite and more potent sodium channel blocker [32]. This transformation being catalyzed by esterase/amidase enzymes, the slow release of deltamethrin used as synergistic agent will allow indoxacarb sufficient time to be bioactivated in DCJW to produce higher effect but at lower concentrations.

5. Conclusions

This study reports the development of new type of formulation that includes two active substances having distinct mode of actions on insect voltage-gated sodium channels. The strategy proposed combines the well-known type II pyrethroid deltamethrin used, for the first time, as synergistic agent and the oxadiazine insecticide indoxacarb. We have shown that unusual calcium-dependent mechanism underlying the action of deltamethrin might be essential in potentiating the inhibition of the sodium current induced by DCJW. The relatively low concentration of nanoencapsulated deltamethrin is also efficient to optimize the effect of indoxacarb / DCJW on sodium channels, while reducing concentration of indoxacarb. Finally in our case, the synergistic effect obtained with nanoencapsulated deltamethrin is more important than that of observed

with conventional formulation that combined deltamethrin and PBO. Consequently, this type of formulation shows great promise as a mixture used against pest insects.

Acknowledgements

JPC is supported by the National Secretariat of Science, Technology and Innovation (SENACYT), Government Authority of the Republic of Panama (contract number: 270-2015-003). Part of this work was supported by funding from Merck Animal Health, Madison, USA.

References

- [1] J.E. Casida, Pesticide Interactions: Mechanisms, Benefits, and Risks, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 4553-4561.
- [2] J.E. Casida, K.A. Durkin, Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects, *Annu. Rev. Entomol.* 58 (2013) 99-117.
- [3] T.C. Sparks, R. Nauen, IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management, *Pestic. Biochem. Physiol.* 121 (2015) 122-128.
- [4] F. Darriet, F. Chandre, 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 (2013) 905-910.
- [5] R. N'Guessan, V. Corbel, J. Bonnet, A. Yates, A. Asidi, P. Boko, A. Odjo, M. Akogbeto, M. Rowland, Evaluation of indoxacarb, an oxadiazine insecticide for the control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), *J. Med. Entomol.* 44 (2007) 270-276.
- [6] R.M. Oxborough, R. N'Guessan, J. Kitau, P.K. Tungu, D. Malone, F.W. Mosha, M.W. Rowland, A new class of insecticide for malaria vector control: evaluation of mosquito nets treated singly with indoxacarb (oxadiazine) or with a pyrethroid mixture against *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*, *Malaria Journal* 14 (2015) 353.
- [7] V. Raymond, D. Goven, Y. Benzidane, O. List, B. Lapied, Influence of Cellular and Molecular Factors on Membrane Target Sensitivity to Insecticides, *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 2974-2987.
- [8] B. Saddiq, M. Ejaz, S.A. Shad, M. Aslam, Assessing the combined toxicity of conventional and newer insecticides on the cotton mealybug *Phenacoccus solenopsis*, *Ecotoxicology* 26 (2017) 1240-1249.
- [9] X. Chen, M. Tie, A. Chen, K. Ma, F. Li, P. Liang, Y. Liu, D. Song, X. Gao, Pyrethroid resistance associated with M918 L mutation and detoxifying metabolism in *Aphis gossypii* from Bt cotton growing regions of China, *Pest Manag. Sci.* 73 (2017) 2353-2359.
- [10] H.A. Khan, W. Akram, S.A. Shad, J.J. Lee, Insecticide mixtures could enhance the toxicity of insecticides in a resistant dairy population of *Musca domestica* L [corrected], *PloS one*, 8 (2013) e60929.
- [11] F. Nikpour, H. Vatandoost, A.A. Hanafi-Bojd, A. Raeisi, M. Ranjbar, A.A. Enayati, M.R. Abai, M. Shayeghi, A.R. Mojahedi, A. Pourreza, Evaluation of Deltamethrin in Combination of Piperonyl Butoxide (PBO) against Pyrethroid Resistant, Malaria Vector, *Anopheles stephensi* in IRS Implementation: an Experimental Semi-Filed Trial in Iran, *J. Arthropod Borne Dis.* 11 (2017) 469-481.
- [12] V. Apaire-Marchais, M. Ogliastro, F. Chandre, C. Penetier, V. Raymond, B. Lapied, Virus and calcium: an unexpected tandem to optimize insecticide efficacy, *Environ. Microbiol. Rep.* 8 (2016) 168-178.
- [13] P. Licznar, O. List, D. Goven, R.N. Nna, B. Lapied, V. Apaire-Marchais, A novel method using *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus for increasing the sensitivity of insecticide through calcium influx in insect cell line, *J. Virol. Met.* 195 (2014) 72-75.
- [14] S.D. Buckingham, M. Ihara, D.B. Sattelle, K. Matsuda, Mechanisms of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting GABA Receptors, *Current medicinal chemistry*, 24 (2017) 2935-2945.
- [15] R.H. Ffrench-Constant, M.S. Williamson, T.G. Davies, C. Bass, Ion channels as insecticide targets, *J. Neurogenet.* 30 (2016) 163-177.
- [16] L.M. Field, T.G. Emyr Davies, A.O. O'Reilly, M.S. Williamson, B.A. Wallace, Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides, *Eur. Biophys. J.* 46 (2017) 675-679.

- [17] M. Ihara, S.D. Buckingham, K. Matsuda, D.B. Sattelle, Modes of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors, *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 2925-2934.
- [18] B. Bodereau-Dubois, O. List, D. Calas-List, O. Marques, P.Y. Communal, S.H. Thany, B. Lapied, 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 (2012) 326-339.
- [19] C. Laviaille-Defaix, B. Moignot, C. Legros, B. Lapied, 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 (2010) 264-272.
- [20] L. Murillo, A. Hamon, Z. Es-Salah-Lamoureux, V. Itier, S. Quinchard, B. Lapied, Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells, *Neurotoxicology* 32 (2011) 828-835.
- [21] M. Nuruzzaman, M.M. Rahman, Y. Liu, R. Naidu, Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application, *Journal of agricultural and food chemistry*, 64 (2016) 1447-1483.
- [22] B. Lapied, C.O. Malécot, M. Pelhate, Ionic species involved in the electrical activity of single aminergic neurons isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*, *J. Exp. Biol.* 144 (1989) 535-549.
- [23] B. Lapied, H. Le Corrionc, B. Hue, Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells, *Brain Research*, 533 (1990) 132-136.
- [24] C. Laviaille-Defaix, H. Gautier, A. Defaix, B. Lapied, F. Grolleau, Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons, *J. Neurophysiol.* 96 (2006) 2437-2450.
- [25] I.M. Chakravarti, R.G. Laha, J. Roy, *Handbook of Methods of Applied Statistics*, 1967.
- [26] G. Bastiat, C.O. Pritz, C. Roider, F. Fouchet, E. Lignieres, A. Jesacher, R. Glueckert, M. Ritsch-Marte, A. Schrott-Fischer, P. Saulnier, J.P. Benoit, A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging, *J. Control. Release* 170 (2013) 334-342.
- [27] B. Heurtault, P. Legrand, V. Mosqueira, J.P. Devissaguet, G. Barratt, C. Bories, The antileishmanial properties of surface-modified, primaquine-loaded nanocapsules tested against intramacrophagic *Leishmania donovani* amastigotes in vitro, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95 (2001) 529-533.
- [28] B. Heurtault, P. Saulnier, B. Pech, J.E. Proust, J.P. Benoit, A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers, *Pharmaceutical Research* 19 (2002) 875-880.
- [29] T.C. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22 (1984) 27-55.
- [30] K.S. Silver, Y. Du, Y. Nomura, E.E. Oliveira, V.L. Salgado, B.S. Zhorov, K. Dong, Voltage-Gated Sodium Channels as Insecticides Targets, *Adv In Insect Phys.* 46 (2014) 45.
- [31] B. Lapied, F. Grolleau, D.B. Sattelle, Indoxacarb, an oxadiazine insecticide, blocks insect neuronal sodium channels, *Br. J. Pharmacol.* 132 (2001) 587-595.
- [32] K. Silver, K. Dong, B.S. Zhorov, Molecular Mechanism of Action and Selectivity of Sodium Channel Blocker Insecticides, *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 2912-2924.
- [33] T.G. Davies, L.M. Field, P.N. Usherwood, M.S. Williamson, DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels, *IUBMB life* 59 (2007) 151-162.
- [34] D.M. Soderlund, Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances, *Arch. Toxicol.* 86 (2012) 165-181.

- [35] L. Annunziato, G. Pignataro, G.F. Di Renzo, Pharmacology of brain Na⁺/Ca²⁺ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives, *Pharmacological Reviews* 56 (2004) 633-654.
- [36] L. Halty-deLeon, B.S. Hansson, D. Wicher, The *Drosophila melanogaster* Na(+)/Ca(2+) Exchanger CALX Controls the Ca(2+) Level in Olfactory Sensory Neurons at Rest and After Odorant Receptor Activation, *Front. Cell. Neurosci.* 12 (2018) 186.
- [37] T.J. Shafer, D.A. Meyer, Effects of pyrethroids on voltage-sensitive calcium channels: a critical evaluation of strengths, weaknesses, data needs, and relationship to assessment of cumulative neurotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196 (2004) 303-318.
- [38] F. Grolleau, B. Lapied, 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 (2000) 1633-1648.
- [39] T. Brustovetsky, M.K. Brittain, P.L. Sheets, T.R. Cummins, V. Pinelis, N. Brustovetsky, KB-R7943, an inhibitor of the reverse Na⁺ /Ca²⁺ exchanger, blocks N-methyl-D-aspartate receptor and inhibits mitochondrial complex I, *Br. J. Pharmacol.*, 162 (2011) 255-270.
- [40] T. Iwamoto, T. Watano, M. Shigekawa, A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchange in cells expressing NCX1, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22391-22397.
- [41] A. Flochlay-Sigognault, F. Guerino, B. Lapied, Parasitocidal combination comprising indoxacarb and deltamethrin, Patent number US 20140170199, E. I. Du Pont De Nemours And Company, 2014.
- [42] C. Deshayes, E. Moreau, J. Pitti-Caballero, J.A. Froger, V. Afaire-Marchais, B. Lapied, Synergistic agent and intracellular calcium, a successful partnership in the optimization of insecticide efficacy, *Curr. Opin. Insect Sci.* 30 (2018) 52-58.
- [43] R.T. von Stein, K.S. Silver, D.M. Soderlund, Indoxacarb, Metaflumizone, and Other Sodium Channel Inhibitor Insecticides: Mechanism and Site of Action on Mammalian Voltage-Gated Sodium Channels, *Pestic. Biochem. Physiol.* 106 (2013) 101-112.
- [44] R. Prasad, A. Bhattacharyya, Q.D. Nguyen, Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1014.
- [45] M.A. Sogorb, E. Vilanova, Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis, *Toxicol. Lett.* 128 (2002) 215-228.

Figure legends

Fig.1. The chemical structure of the pyrethroid insecticides deltamethrin (A) and permethrin (B) are shown together with structures of the oxadiazine insecticide indoxacarb (R = COOCH₃) and the decarbomethoxylated JW062 (R = H; DCJW) (C).

Fig.2. Effects of deltamethrin and permethrin on intracellular calcium concentration in Fura-2 loaded isolated DUM neuron cell bodies. (A) Fura-2 fluorescence of a single DUM neuron cell body after bath application of deltamethrin (10⁻⁶M) (a) and permethrin (10⁻⁶M) (b). Images shown were acquired 200 sec, 450 sec and 700 sec after the start of insecticide exposures. (B) Intracellular calcium concentration variations were plotted as a function of time of deltamethrin (red) and permethrin (black) treatments. Note that only deltamethrin (10⁻⁶M) triggered an intracellular calcium rise in isolated DUM neuron cell body. Scale bar, 50 μm.

Fig.3. Deltamethrin-induced intracellular calcium rise in Fura-2 loaded isolated DUM neuron cell body. (A) Pretreatment with the inorganic calcium channel blocker CdCl₂ (5.10⁻⁴M) did not produce any effect on the intracellular calcium concentration elevation produced by deltamethrin (10⁻⁶M) (a,b; red). By contrast, pretreatment with the sodium channel blocker tetrodotoxin (TTX, 10⁻⁷M) (a) and by Kb-R7943 (5.10⁻⁶M) (b), an inhibitor of the reverse Na⁺/Ca²⁺ exchanger completely abolished the deltamethrin-induced intracellular calcium rise (black). (B) Three-dimensional spatiotemporal models of Fura-2

fluorescence of a single DUM neuron cell body after application of deltamethrin (10^{-6}M) obtained under different experimental conditions as indicated in (a), (b) and (c).

Fig.4. Synergistic effect produced by deltamethrin on the DCJW-induced inhibition of the sodium current. (A) Comparative histogram of the percentage of inhibition of the sodium current amplitude after 20 minutes of treatment with permethrin (10^{-5}M) alone (n=4), DCJW (10^{-7}M) alone (n=6) and with DCJW (10^{-7}M) combined with permethrin (10^{-5}M) (n=9). (B) Comparative histogram of the percentage of inhibition of the sodium current amplitude after 20 minutes of treatment with deltamethrin ($3 \cdot 10^{-6}\text{M}$) alone (n=5), DCJW (10^{-7}M) alone (n=6) and with DCJW (10^{-7}M) combined with deltamethrin ($3 \cdot 10^{-6}\text{M}$) (n=6). (C) Semi-logarithmic dose-response curve for the blockade of sodium current obtained after 20 minutes of treatment with deltamethrin ($3 \cdot 10^{-6}\text{M}$) in combination with DCJW (from 10^{-10} to 10^{-7}M) (n=6). Arrow indicates the concentration of deltamethrin used to obtain the synergistic effect. Data are means \pm S.E.M. Statistical test is one-way ANOVA, followed by *post-hoc* Bonferroni's test. ns (not significant) $p > 0.05$; ** $p < 0.01$.

Fig.5. Effects of deltamethrin on adult male cockroaches *Periplaneta americana*. Cockroaches were fed orally with $10\mu\text{L}$ of deltamethrin ranging from 10^{-7}M to 10^{-4}M . Mortality rate was assessed 24h (A), 48h (B) and 72h (C) after intoxication. Between 60 and 100 cockroaches were used for each concentration. Smooth lines represent the best fit through the mean data

according to the equation (2) (D-F) Histograms illustrating comparative effects of indoxacarb tested alone at 10^{-7}M , 10^{-6}M and 10^{-5}M and indoxacarb associated with deltamethrin (10^{-5}M) or deltamethrin (10^{-6}M) at 24h (D), 48h and 72h (F). Data are means \pm S.E.M (n=4-9). Statistical test is Mann-Whitney. ns (not significant) $p>0.05$; * $p<0,05$; ** $p<0.01$.

Fig.6. Effects of deltamethrin and nanoencapsulated deltamethrin (LNC-deltamethrin) intoxications on adult male cockroaches *Periplaneta americana*. (A) Comparative histograms of the effects of sublethal concentration of LNC-deltamethrin (10^{-5}M) tested alone and deltamethrin (10^{-5}M) in combination with PBO (piperonyl butoxide; $50\mu\text{g}/\text{cockroach}$) at 24h, 48h and 72h. (B-D) Superimposed semi-logarithmic concentration-response curves for the mortality rate produced by deltamethrin alone (grey) and LNC-deltamethrin (orange) at 24h (B), 48h (C) and 72h (D), Smooth lines represent the best fit through the mean data according to the equation (2). Data are means \pm S.E.M (n= 4,17). Statistical test is Mann-Whitney. ns (not significant) $p>0.05$; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

Fig.7. Comparative histogram summarizing the mortality rate produced by LNC-deltamethrin (10^{-6}M) and deltamethrin (10^{-6}M) alone versus different concentrations of indoxacarb (10^{-7}M , 10^{-6}M and 10^{-5}M) on adult male cockroaches *Periplaneta americana* at 24h (A), 48h (B) and 72h (C). Data are means \pm S.E.M (n= 5-10). Statistical test is Mann-Whitney. ns (not significant)

$p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Mortality rate for “no deltamethrin” groups are only in the graphs as an indication.

Fig.8. Enzymatic protection of deltamethrin by nanoencapsulation. (A) *In vitro* deltamethrin hydrolysis. % of deltamethrin in solution, loaded in LNC (●) or soluble in DMSO/water 1/49 (v/v) (■) versus time in presence of esterase (0.009 U/mL). Initial concentration of deltamethrin 95 $\mu\text{g/mL}$ ($n=3$, mean \pm SD). (B) Comparative effects of the mortality rate produced by the mixture LNC-deltamethrin (10^{-6}M) / indoxacarb (10^{-6}M) versus deltamethrin (10^{-6}M) in combination with the enzymatic inhibitor PBO / indoxacarb (10^{-6}M) on adult male cockroaches *Periplaneta americana* at 48h and 72h. Data are means \pm S.E.M ($n= 4-10$). Statistical test is Mann-Whitney. ** $p < 0.01$. Mortality rate for “indoxacarb (10^{-6}M)” groups are only in the graph as an indication.

Fig. 9 Hypothetic pattern summarizing the strategy proposed to optimize the effect of DCJW (*in vitro*) and indoxacarb (*in vivo*) by deltamethrin used as a chemical synergistic agent. In isolated short-term cultured insect neurons (A), the modulation of voltage-gated sodium channels induced by deltamethrin (1) produces an increase in intracellular sodium concentration along with membrane depolarization, which thereby favors the influx of calcium *via* the Na/Ca exchanger (reverse mode) (2). The resulting elevation of intracellular Ca^{2+} concentration (3) renders voltage-gated sodium channel more sensitive to lower concentration of DCJW (4). Nanoencapsulation (B) helps to protect deltamethrin, *in vivo*, from esterase-induced enzymatic degradation.

Nevertheless, esterases are essential in the selective conversion of indoxacarb to DCJW (5).

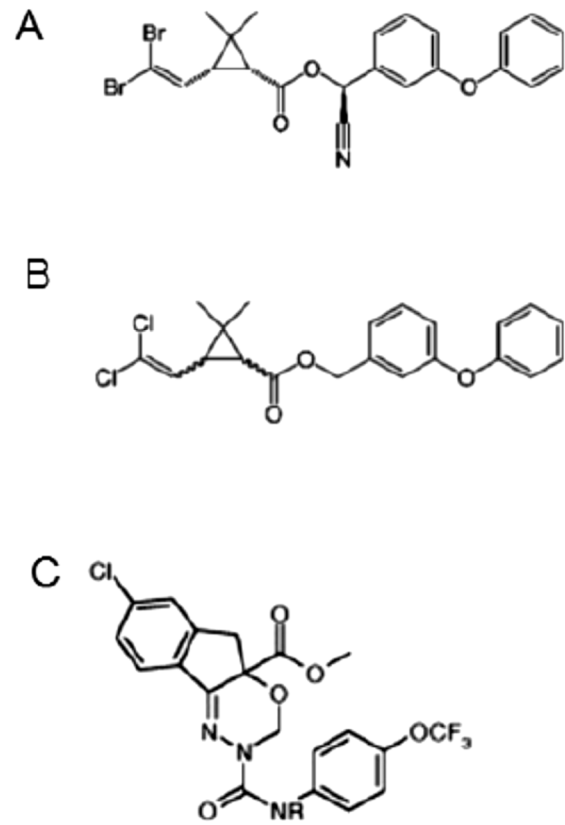


Figure 1

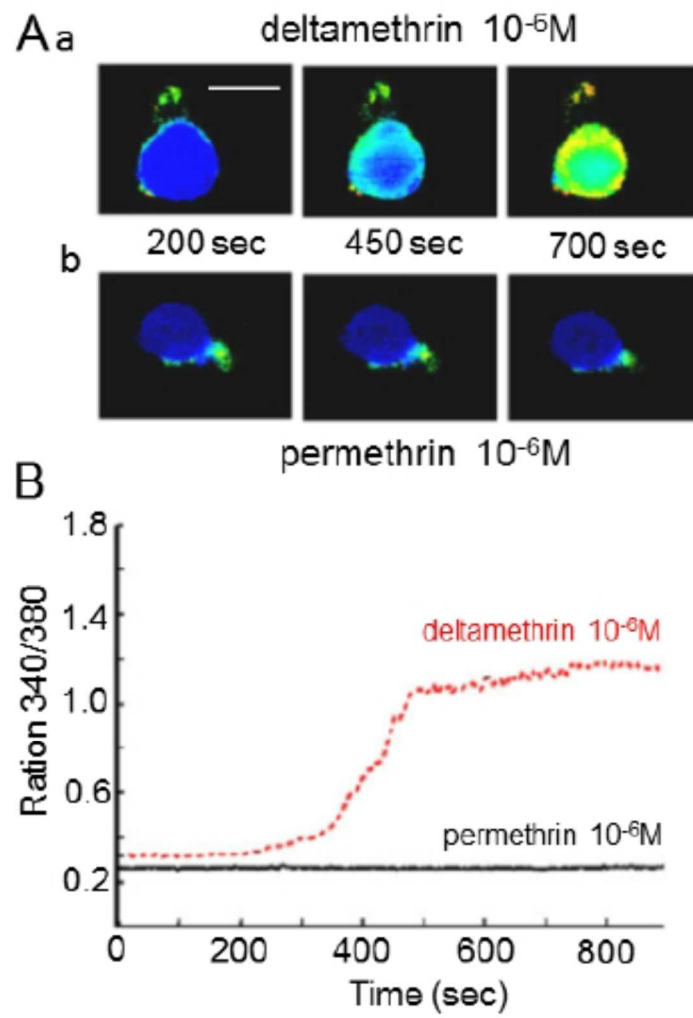


Figure 2

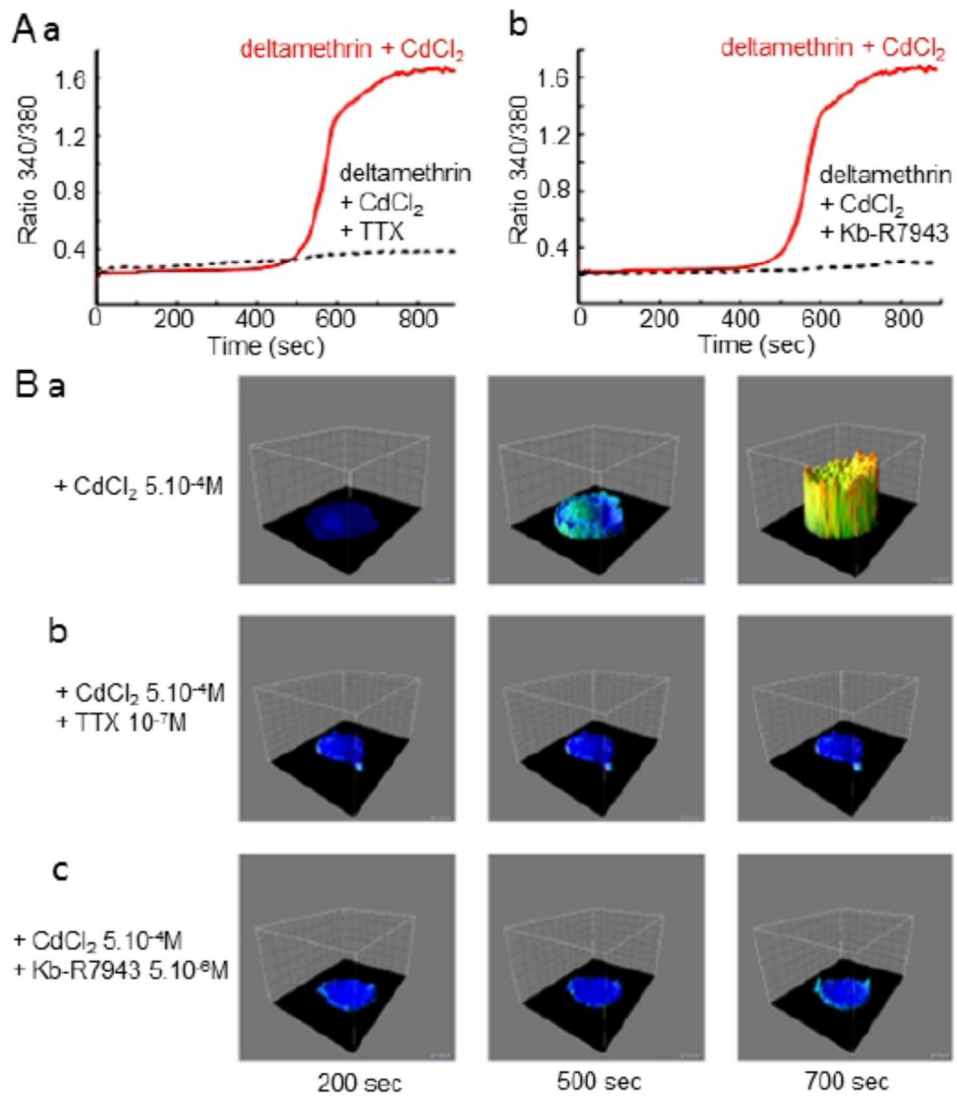


Figure 3

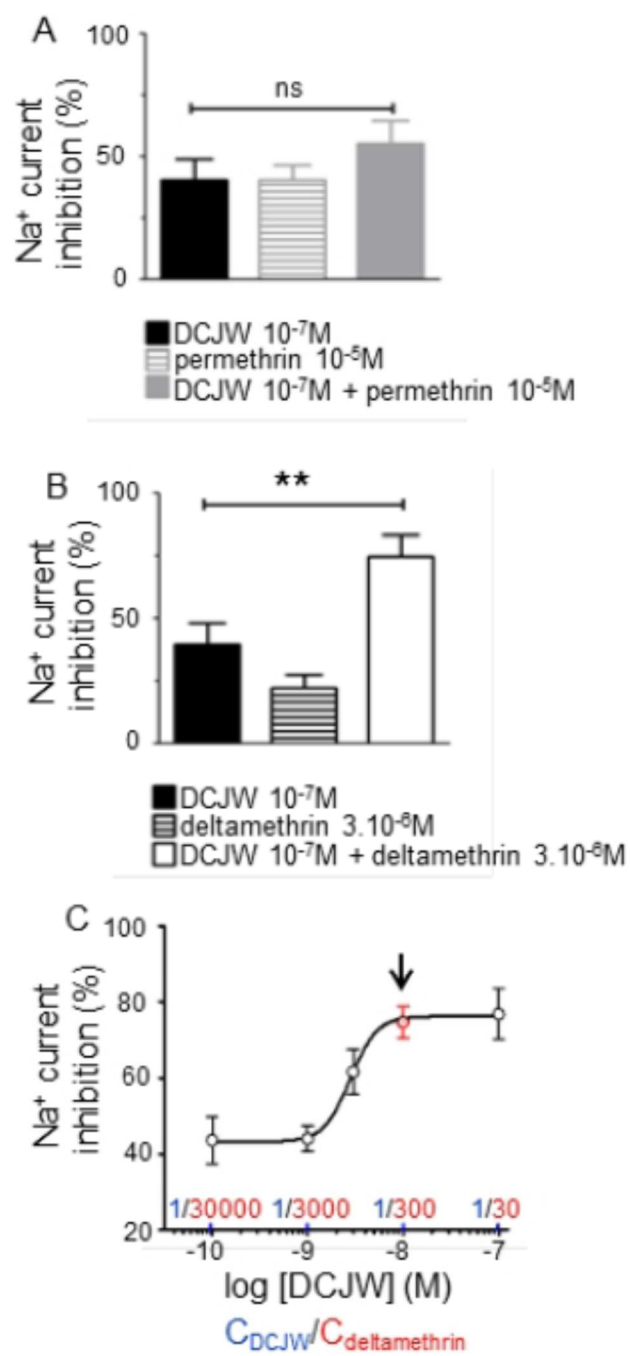


Figure 4

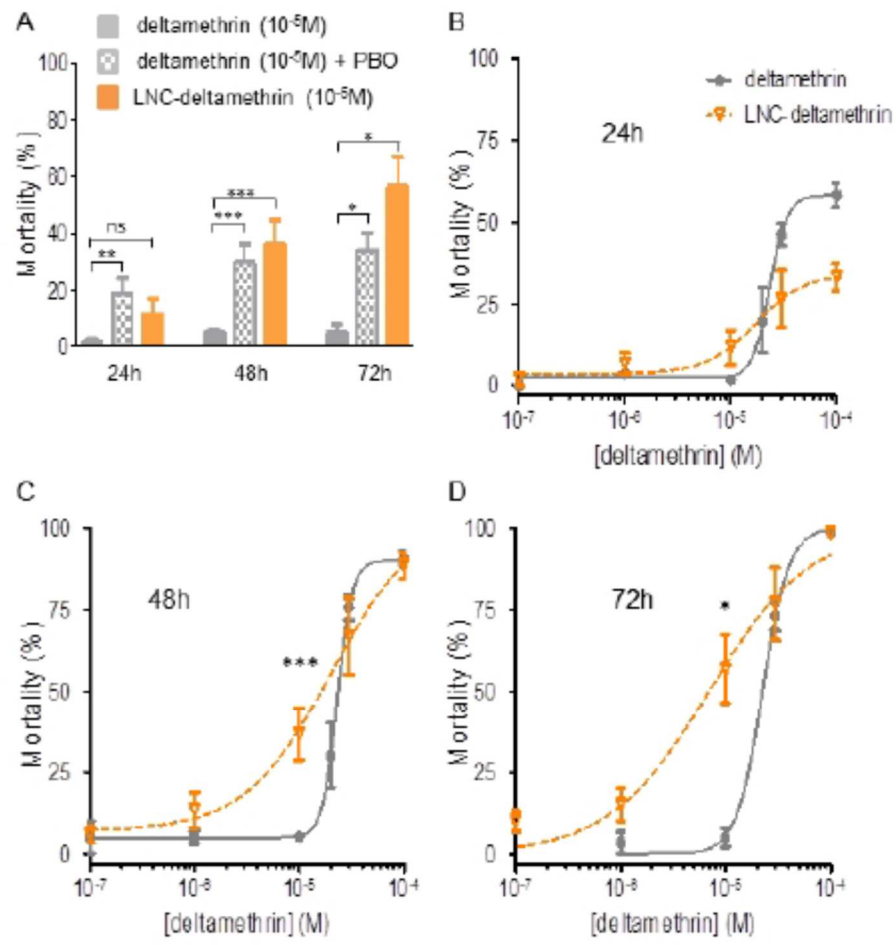


Figure 6

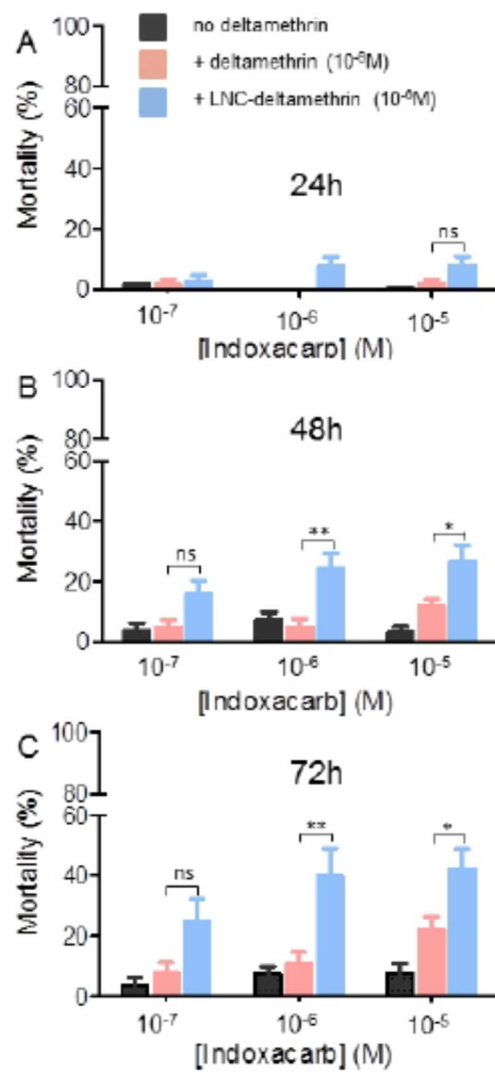


Figure 7

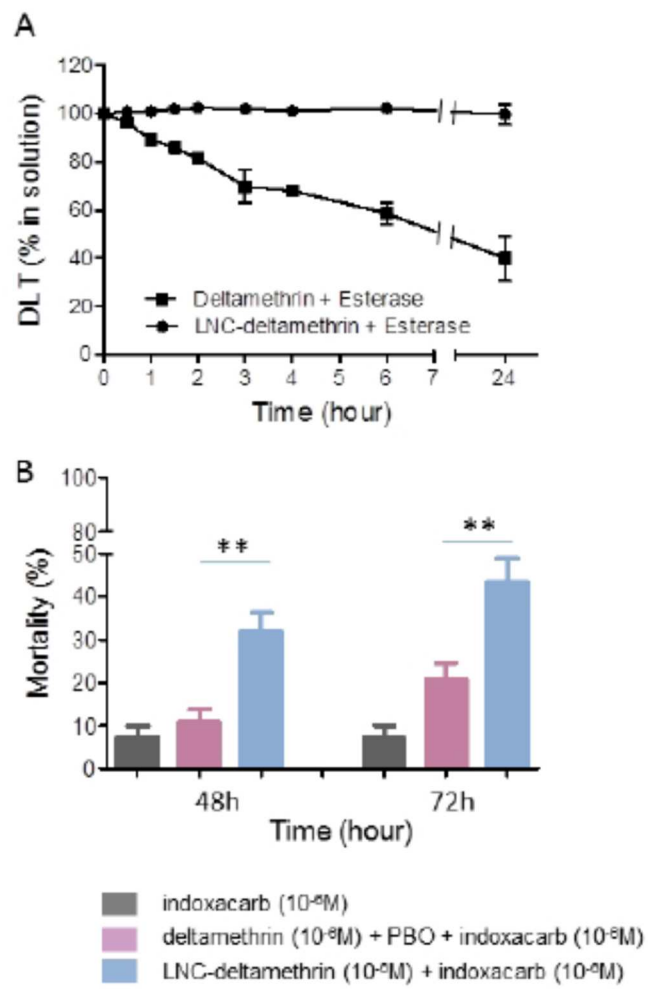


Figure 8

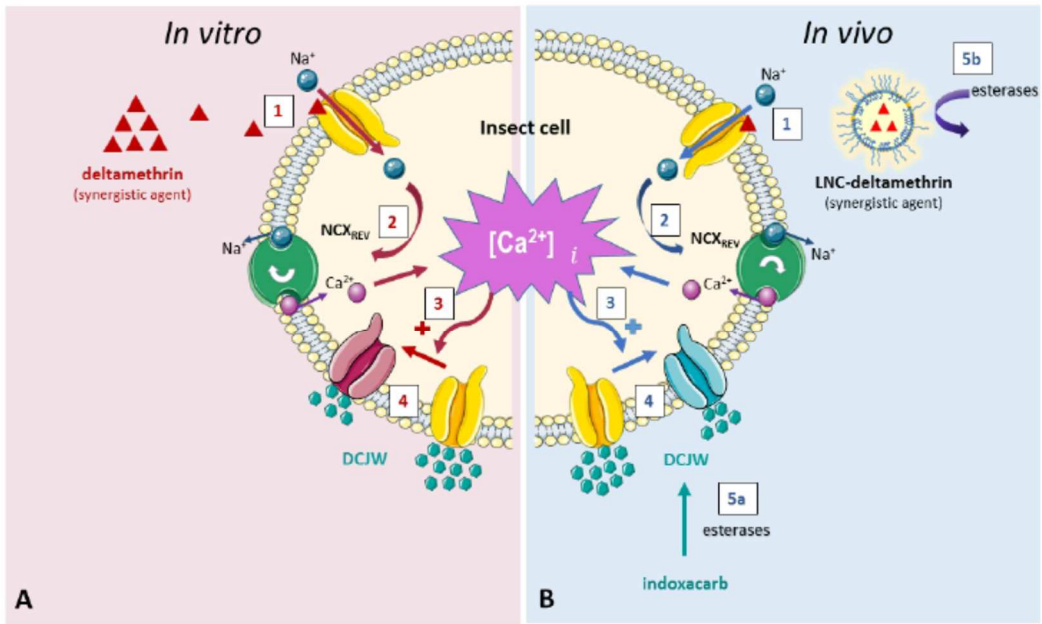


Figure 9

Titre : Nanoencapsulation d'un agent synergisant chimique, la deltaméthrine pour potentialiser l'effet d'un insecticide, l'indoxacarbe contre les insectes nuisibles

Mots clés : *Insecticide, Nanoencapsulation, Agent Synergisant, Formulation phytosanitaire.*

Résumé : L'utilisation non raisonnée d'insecticides a des conséquences sur l'environnement et la santé humaine mais aussi sur le développement de résistances chez les insectes nuisibles. Dans ce contexte, ce travail de thèse porte sur le développement d'une technique de nanoencapsulation d'un agent synergisant chimique, la deltaméthrine (pyréthrine), associée à un pro-insecticide l'indoxacarbe (oxadiazine). Sur la base d'études *in vitro* sur cellules neurosecrétices de blattes (*Periplaneta americana*), une action synergique entre la deltaméthrine et le DCJW (métabolite actif de l'indoxacarbe) a été démontrée via un mécanisme intracellulaire original dépendant du calcium. Des études toxicologiques *in vivo* sur des blattes adultes ont permis de confirmer l'effet synergique entre la deltaméthrine et l'indoxacarbe.

Pour optimiser la formulation de l'association de ces composés, des nanocapsules lipidiques contenant la deltaméthrine utilisée comme agent synergisant ont été produites. Les études de toxicité sur blattes ont permis de déterminer les doses effectives les plus faibles de l'association deltaméthrine nanoencapsulée/indoxacarbe et d'obtenir une optimisation de l'effet synergique avec la deltaméthrine nanoencapsulée. Cet effet synergique est plus important que celui du piperonyl butoxyde, composé utilisé dans les formulations d'insecticides classiques. Les résultats indiquent que la deltaméthrine, protégée des estérases par la nanoencapsulation, permet d'optimiser l'efficacité du traitement tout en réduisant les doses d'indoxacarbe. Cette nouvelle stratégie est une première étape dans le développement d'une formulation phytosanitaire efficace contre les insectes nuisibles.

Title : Nanoencapsulated deltamethrin potentiates the effect of an oxadiazine insecticide indoxacarb against insects

Keywords : *Insecticide, Nanoencapsulation, Synergistic agent, Crop protection.*

Abstract: The over-use of pesticides has represented a concern not only for its consequences against the environment but also for the increase of resistance mechanisms in pest insects. In this context, our research project is focused on the development of a nanoencapsulation technique of deltamethrin (pyrethroid), used as synergistic agent, combined with a pro-insecticide, indoxacarb (oxadiazine). Based on *in vitro* studies performed on cockroach (*Periplaneta americana*) neurosecretory cells, the synergistic effect between deltamethrin and DCJW (active metabolite of indoxacarb), occurring through an original calcium-dependent intracellular mechanism, has been characterized. *In vivo* toxicological studies on adult cockroaches have confirmed these previous results.

To optimize the formulation including the synergistic agent and indoxacarb, lipid nanocapsules (LNCs) containing deltamethrin have been produced. It has been possible to determine the lower effective doses of LNC-deltamethrin/indoxacarb mixture producing the synergistic effect in whole insects. The synergism obtained is more important than that of obtained with piperonyl butoxide, the well-known synergist used in classical insecticide formulations. These results also indicate that LNC-deltamethrin, protected from esterase-induced detoxification enhances the toxicity of indoxacarb while reducing doses. This novel strategy is a first step for the development of a novel formulation more efficient against pest insects.