HAL
open science

Physiopathologie de l'endothélium : Applications à l'angiogenèse induite par les répulsifs anti-moustiques à base de DEET et à la dysfonction endothéliale dans le cadre du diabète de type 1

Samuel Legeay

To cite this version:

Samuel Legeay. Physiopathologie de l'endothélium : Applications à l'angiogenèse induite par les répulsifs anti-moustiques à base de DEET et à la dysfonction endothéliale dans le cadre du diabète de type 1. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2016. Français. NNT : 2016ANGE0068 . tel-03026063

HAL Id: tel-03026063

https://theses.hal.science/tel-03026063v1

Submitted on 26 Nov 2020

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

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

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

université angers

Thèse de Doctorat

Samuel LEGEAY

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : Biologie - Santé
Discipline : Pharmacologie expérimentale et clinique
Spécialité : Pharmacologie moléculaire et toxicologie
Unité de recherche : *SOPAM INSERM U1063*
UFR Santé – Département Pharmacie
Thèse N : 166034

Soutenue le 16 novembre 2016

Physiopathologie de l'endothélium

Applications à l'angiogenèse induite par les répulsifs anti-moustiques à base de DEET et à la dysfonction endothéliale dans le cadre du diabète de type 1

JURY

Rapporteurs : **Christophe RIBUOT**, PU, Université Grenoble Alpes
Vincent RICHARD, PU-PH, Université de Rouen Normandie

Examinateurs : **Éric BELIN DE CHANTEMELE**, Assistant Professor, Université d'Augusta (Géorgie, USA)
Jean-Pierre BENOIT, PU-PH, Université Bretagne Loire

Directeur de Thèse : **Sébastien FAURE**, PU, Université Bretagne Loire

BY NC ND

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné Samuel Legeay
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire cette thèse.

signé le 08/11/2016

CC BY NC ND

CC BY NC ND

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

- Vous devez le citer 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.

Consulter la licence creative commons complète en français :
http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.

CC BY NC ND

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury :

Messieurs les Professeurs Vincent Richard et Christophe Ribuot, de l'Université de Rouen-Normandie et Grenoble-Alpes, pour avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. Je suis honoré et me réjouis de votre présence et de l'apport de votre expertise dans le domaine des pathologies cardiovasculaires ainsi que sur les mécanismes d'angiogenèse.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Benoit, de l'Université d'Angers, pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Je suis extrêmement reconnaissant de l'intérêt que vous portez pour ce travail. Soyez assuré de mon immense gratitude.

Monsieur Eric Belin de Chantemèle, Assistant Professor à l'Université d'Augusta (Géorgie, USA) pour avoir accepté de venir à Angers et de participer au jury de cette thèse. Je n'oublierai jamais ton accueil lorsque je suis arrivé à Augusta et garde un beau souvenir de cette expérience. J'espère que nos projets communs perdureront et permettront peut-être un jour d'officialiser une collaboration.

J'adresse également mes plus profonds remerciements à mon directeur de thèse, le Professeur Sébastien Faure. Ta confiance et tes conseils ont été pour moi d'une aide indispensable pendant toute la durée de cette aventure. Merci !

J'ajoute une attention toute particulière à Nicolas Clere. Merci pour ton aide, ton écoute, ta disponibilité et tes conseils ainsi que pour les travaux préliminaires que tu avais effectués avant mon arrivée sur ce projet.

Merci à l'UFR Santé et particulièrement au département Pharmacie et à tous les enseignants qui y sont rattachés. J'ai notamment vraiment apprécié ces deux années de monitorat au sein du service de Physiologie et Pharmacologie, j'espère que j'aurai le plaisir de continuer à travailler à vos côtés.

Je remercie le laboratoire SOPAM pour avoir financé une partie de ce projet.

Merci également à ceux qui ont eu la chance (et surtout l'honneur) de faire partie du bureau des winners de la SOPAM Team. Merci pour tous ces supers moments partagés ensemble.

Je tiens également à remercier Nolwenn ainsi qu'Anne du laboratoire MINT pour leur confiance et leur aide précieuse quand j'en ai eu besoin.

Also, I can't forget to acknowledge the Eric's lab members: Jessica, Simone and Galina. Thank you girls for all you did for me.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui me sont chers :

Ma famille, mes parents qui m'ont soutenu durant ces années. Mon frère et ma sœur.

Mes amis de Feucansou et les Soulairois

Claire…

CC BY NC ND

CC BY NC ND

SOMMAIRE

ABREVIATIONS 9
INTRODUCTION 15
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES 17
PREMIERE PARTIE : LA CELLULE ENDOTHELIALE 17
1 - Histologie des vaisseaux 17
2 - Physiologie de l'endothélium 19
a) Différents endothéliums 19
b) Physiologie moléculaire de l'endothélium 22
c) Pathologies liées à l'endothélium 27
DEUXIEME PARTIE : DEET ET ANGIOGENESE 29
1 - L'angiogenèse 29
a) Définition 29
b) Voies de signalisation impliquées dans le processus angiogénique 30
2 - le *N*,*N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) 36
a) Propriétés physico-chimiques 36
b) Historique 36
c) Utilisation, produits commercialisés et réglementation 37
d) Cibles du DEET chez le moustique et mécanisme d'action 39
e) Mésusage, environnement, exposition et résistance des insectes 41
f) Pharmacocinétique du DEET chez l'Homme 42
g) Effets indésirables des répulsifs à base de DEET 43
h) Cibles du DEET identifiées chez l'Homme 45
3 - Hypothèse de l'effet pro-angiogénique du DEET 45
TROISIEME PARTIE : ROLE DE PTP1B ET DU STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE INDUITE PAR LE DIABETE DE TYPE 1 49
1 - Diabète type 1 49
a) Epidémiologie et étiologie 49
b) Traitements 51
2 - Complications vasculaires du DT1 52
a) Micro- et macroangiopathie 52
b) La dysfonction endothéliale induite par le diabète 53
3 - Lien entre PTP1B et stress du RE dans la dysfonction endothéliale 54
a) PTP1B 54
b) Stress du réticulum endoplasmique 56

CC BY NC ND

4 - Hypothèse de travail 58
RESULTATS 61
PREMIERE ETUDE : EVALUATION DE L'EFFET DU DEET DANS LES PROCESSUS MENANT A L'ANGIOGENESE 61
1 - Objectifs de l'étude 61
2 - Méthodes 61
3 - Résultats 71
4 - Discussion, conclusion et perspectives 83
DEUXIEME ETUDE : ROLE DE PTP1B ET DU STRESS DU RE DANS LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE INDUITE PAR LE DIABETE 89
1 - Résultats préliminaires 89
2 - Objectifs de l'étude 92
3 - Méthodes 92
4 - Résultats 95
5 - Discussion, conclusion et perspectives 103
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 107
REFERENCES 111
PUBLICATIONS – COMMUNICATION 133
ANNEXE 1 : Publication 135
ANNEXE 2 : Informations supplémentaires 149

CC BY NC ND

ABREVIATIONS

AA : Acide arachidonique

AC : Adénylate cyclase

Ach : Acétylcholine

AchE : Acétylcholinestérase

ADP : Adénosine diphosphate

AGEs : Produits finaux de la glycation avancée

AMM : Autorisation de mise sur le marché

AMPc : Adénosine monophosphosphate cyclique

AMPK : 5' AMP-activated protein kinase

ANG : Angiopoïétine

ATF : Activating transcription factor

BiP : Binding immunoglobulin protein (également connu sous le nom GRP78)

BKCa : Canaux potassiques calcium dépendants

BNP : Péptide cérébral natriurétique

CETs : Cellules endothéliales tumorales

ChAT : Choline acétyltransférase

CHOP : CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein

CIRC : Centre de recherche international sur le cancer

CML : Cellule musculaire lisse

CO : Monoxyde de carbone

CO_2 : Dioxyde de carbone

COXs : Cyclooxygénases

CRP : C reactive protein

CYP : Cytochrome P450

DAB : Diaminobenzidine

DAG : Diacylglycérol

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DEET : *N*,*N*-diéthyl-*m*-toluamide

Dll4 : Delta-like ligand 4

CC BY NC ND

DT1 : Diabète de type 1

DT2 : Diabète de type 2

EC_{50} : Concentration efficace 50

ECG : Electrocardiogramme

ECKO : Endothelial cell specific knock out

EDHF : Endothelium-derived hyperpolarizing factor

EETs : Acides époxyeicosatriénoïques

eNOS : endothelial NO synthase

ET : Endothéline

FAK : Focal adhesion kinase

FGF : Fibroblast growth factor

GCs : Guanylate cyclase soluble

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GRs : Récepteurs gustatifs

GRP78 : Glucose-regulated protein 78 (également connu sous le nom BiP)

H_2O_2 : Péroxyde d'hydrogène

H_2S : Sulfure d'hydrogène

HAECs : Human aortic endothelial cells

HEK 293 : Human embryonic kidney 293

HIF-1α : Hypoxia inducible factor 1α

HLA : Human leukocyte antigen

HUVECs : Human umbilical venous endothelial cells

IC_{50} : Concentration inhibitrice 50

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule 1

Il : Interleukine

IP : Récepteur aux prostaglandines

IP_3 : Inositol triphosphate

IR : Récepteur à l'insuline

IRs : Récepteurs ionotropes

IRE1 : Inositol-requiring enzyme 1

cc BY NC ND

IRS1 : Insulin receptor substrate 1

JNK : Jun amino-terminal kinases

KO : Knock out

L-NAME : N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MEC : Matrice extracellulaire

miR : micro RNA

MMPs : Métalloprotéinases de la matrice

NADPH/NADP : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NFκB : Nuclear factor-κB

NICD1 : Domaine intracellulaire Notch 1

NO : Monoxyde d'azote

NRP1 : Neuropiline 1

O_2 : Dioxygène

$O_2^{\bullet -}$: Anion supéroxyde

•OH : Radical hydroxyde

ORs : Récepteurs odorants

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor 1

PDGF-B : Platelet-derived growth factor B

PECAM : Platelet endothelial cell adhesion molecule

PERK : Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase

pFHHSiD : para-fluorohexahydrosiladiphenidol

PFKFB3 : 6-PhosphoFructose-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphate 3

PGE2 : Prostaglandine E2

PGH2 : Prostaglandine H2

PGI2 : Prostaglandine I2

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PIP_2 :Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PKC : Protéine kinase C

PKG : Protéine kinase G

cc BY NC ND

PLA2 : Phospholipase A2

PlGF : Placenta growth factor

PTPs : Protein tyrosine phosphatase

PTP1B :Protein tyrosine phosphatase 1B

RE : Réticulum endoplasmique

ROS : Reactive oxygen species

RPE : Résonance paramagnétique électronique

SCNN : Système cholinergique non neuronal

SEM : Ecart-type standard à la moyenne

SNC : Système nerveux central

SNP : Nitroprussiate de sodium

STZ : Streptozotocine

SVF : Sérum de veau fœtal

$t_{1/2}$: Temps de demi vie

TGF-β : Transforming growth factor β

TIMPs : Tissue inhibitor of metalloproteases

TKs : Tyrosine Kinases

TLRs : Tool like receptors

TNFα : Tumor necrosis factor α

TXA2 : Thromboxane A2

UP_4A : Uridine adenosine tétraphosphate

UPR : Unfolded protein response

UTP : Uridine triphosphate

VAChT : Transporteurs vésiculaires intracellulaires de l'Ach

VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1

VE-cadhérines : Cadhérines de l'endothélium vasculaire

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VEGFR : Récepteur du VEGF

WT : Wilde type

XBP1 : X-box binding protein 1

cc BY NC ND

CC BY NC ND

CC BY NC ND

INTRODUCTION

Après la découverte du monoxyde d'azote (NO) ainsi que des autres médiateurs endothéliaux induisant une vasodilatation ou une vasoconstriction[1–7], l'endothélium a été identifié comme un organe à part entière intervenant directement dans la régulation de la pression artérielle. Aujourd'hui, l'implication de l'endothélium est élargie à de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques, au-delà même de ses fonctions primaires puisqu'il joue un rôle dans les phénomènes d'inflammation, d'angiogenèse, de prolifération de cellules musculaires lisses et de catabolisme et de métabolisme de nombreux médiateurs notamment hormonaux[8] (Figure 1).

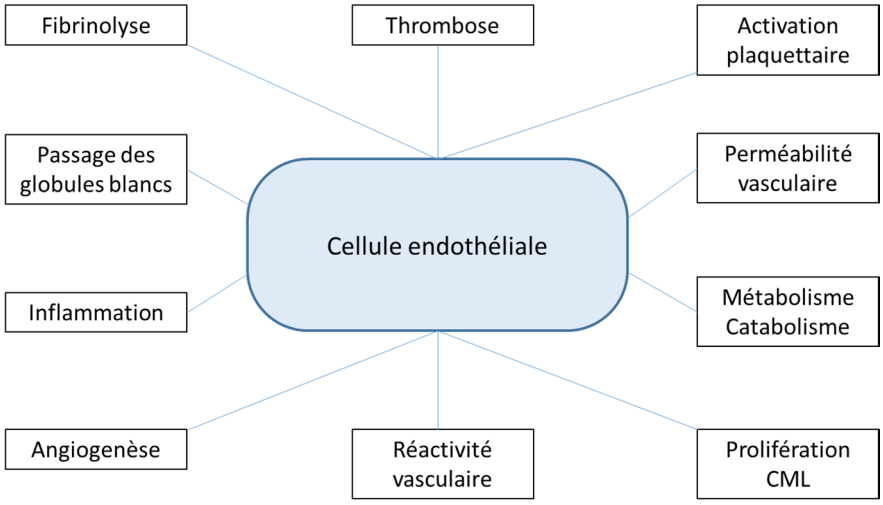


Figure 1 : Les multiples fonctions de l'endothélium.

Basés sur des études approfondies de la littérature scientifique, les travaux réalisés durant cette thèse ont permis d'étudier l'endothélium sous deux facettes. Tout d'abord, à travers la thématique de l'exposition à des toxiques environnementaux, les mécanismes angiogéniques ont été étudiés. Ainsi, l'effet du *N*,*N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET), un répulsif anti-moustiques très utilisé partout dans le monde, a été évalué sur cellules endothéliales ainsi que sur des modèles animaux. Ensuite, la dysfonction endothéliale dans le cadre du diabète de type 1 (DT1) a fait l'objet d'une seconde étude. Plus précisément, les rôles du stress du réticulum endoplasmique (RE) et de la *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP1B) dans la dysfonction endothéliale induite par le DT1 ont été évalués *in vitro* et *in vivo*.

CC BY NC ND

BY NC ND

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

PREMIERE PARTIE : LA CELLULE ENDOTHELIALE

Les cellules endothéliales sont des cellules de forme allongée et d'une taille variant de 0,10 à 0,20 µm de large et 100 à 200 µm de long. Elles constituent une paroi interne unicellulaire présente au niveau des vaisseaux sanguins, lymphatiques et de la cavité cardiaque appelée endothélium. L'endothélium étant le seul épithélium en contact direct et permanent avec le sang, son rôle physiologique a longtemps été réduit aux processus d'hémostase. Cette particularité lui confère des propriétés uniques dans la régulation de l'agrégation plaquettaire et de la coagulation.

Au niveau embryologique, les cellules endothéliales sont dérivées des progéniteurs endothéliaux (ou angioblastes) provenant à l'origine du mésoderme. Elles vont être parmi les premières cellules à se différencier afin de former l'aorte dorsale, le premier vaisseau capillaire permettant la réception puis la circulation des cellules sanguines nouvellement différenciées[9,10]. Ce capillaire va ensuite s'étendre afin de rejoindre le cœur d'un côté et de l'autre se diviser en différentes branches de façon à former le réseau vasculaire alimentant les autres cellules en cours de différenciation. Durant l'embryogenèse mais également la fœtogenèse puis tout au long de la vie, le développement du réseau vasculaire sera médié par les cellules endothéliales afin d'alimenter les différents organes. Il est estimé qu'à l'âge adulte, le corps humain contient entre 10^{10} et 10^{13} cellules endothéliales constituant un organe pesant près d'un kilo[11].

Cette première partie situe d'abord l'endothélium au sein de l'organisme en abordant l'histologie des vaisseaux, puis la physiologie de la cellule endothéliale. Enfin, les principales pathologies faisant intervenir l'endothélium seront détaillées.

1 - Histologie des vaisseaux

Grâce notamment au transport d'oxygène, de nutriments et de molécules de signalisation, à l'évacuation de déchets et à la circulation de cellules de l'immunité, le système vasculaire maintient l'homéostasie tissulaire. Il est constitué d'artères, de veines et de capillaires.

CC BY NC ND

Les artères sont des vaisseaux sanguins qui conduisent le sang provenant du cœur vers les autres organes. Hormis l'artère pulmonaire, toutes les artères transportent du sang préalablement oxygéné par les poumons. L'hémoglobine du sang artériel est ainsi saturée à plus de 95 % en oxygène[12]. Etant directement situées en aval du cœur, les artères permettent l'avancée de l'onde de pouls. La pression artérielle est ainsi mesurée à partir de cet organe. Elles sont constituées d'une couche musculaire importante permettant la vasoconstriction et la vasodilatation. Les artères ont donc un rôle important dans la régulation de la pression artérielle (Figure 2).

Les veines sont des vaisseaux sanguins qui conduisent le sang des organes vers le cœur. A l'exception de la veine pulmonaire, le sang transporté par les veines est peu oxygéné, son hémoglobine étant saturée entre 60 et 80 % en oxygène[12]. Les veines ont un potentiel de vasomotricité quasiment nul à cause de leur faible couche musculaire. Cependant, elles sont dotées de valves qui permettent d'éviter le reflux sanguin, dirigeant ainsi le sang à sens unique des tissus vers le coeur[12] (Figure 3).

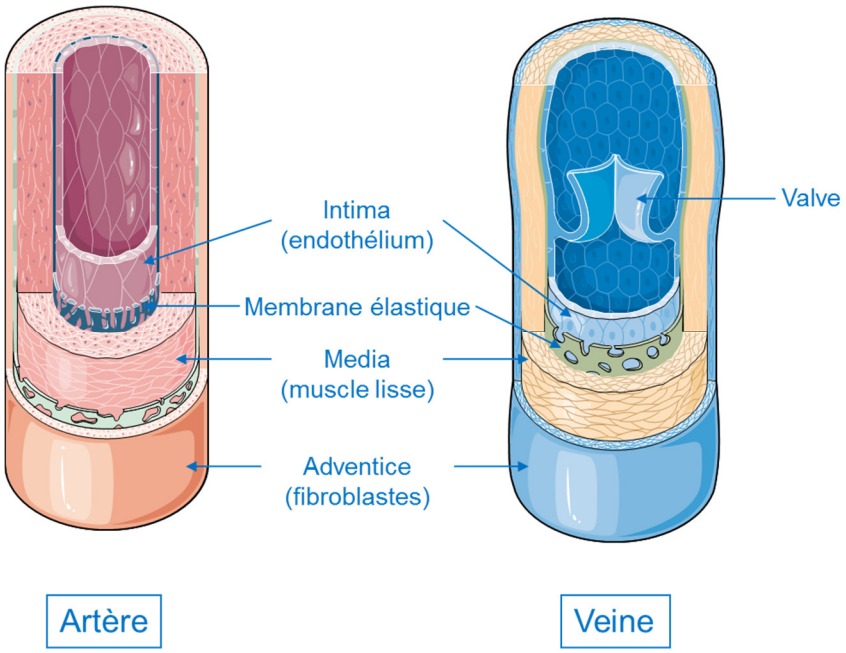


Figure 3 : Différence de structures histologiques entre les artères et les veines.

Le réseau de capillaires quant à lui permet de faciliter les échanges entre les composants du sang et les tissus. Ce sont des petits vaisseaux sanguins d'un diamètre ne dépassant pas 10 µm, composés essentiellement de l'endothélium, d'une lame basale externe et de cellules périphériques, dans ce cas, des péricytes (Figure 4).

CC BY NC ND

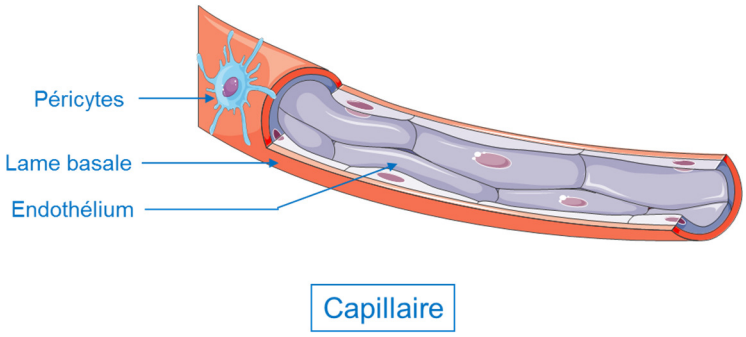


Figure 4 : Structure histologique d'un capillaire.

2 - Physiologie de l'endothélium

L'endothélium est donc le constituant commun de tous les vaisseaux sanguins de l'organisme. Cependant, la physiologie et par conséquent le phénotype des cellules endothéliales diffèrent selon leur localisation d'une part au niveau de l'arbre vasculaire et d'autre part selon les organes.

a) Différents endothéliums

L'endothélium peut être classé en trois grandes catégories : l'endothélium continu non fenestré, qui constitue principalement l'endothélium des artères et des veines, l'endothélium continu fenestré, qui constitue la grande majorité de l'endothélium des capillaires et l'endothélium discontinu qui est particulier aux sinus hépatiques et peut être retrouvé au sein de la vascularisation tumorale[13].

L'endothélium continu non fenestré

L'endothélium continu non fenestré est composé de cellules endothéliales jointes par des jonctions serrées (*zona occludens*). Le transport des molécules de part et d'autre de l'endothélium s'effectue principalement par des mécanismes de transcytose impliquant les cavéoles. L'eau ainsi que les petites molécules solubilisées traversent difficilement l'endothélium en empruntant des voies paracellulaires. Le transport des ions et des molécules plus volumineuses non prises en charge par les cavéoles s'effectue par le biais de canaux transendothéliaux.

CC BY NC ND

L'endothélium continu fenestré

L'endothélium continu fenestré, grâce à des jonctions d'ancrage et communicantes, est quant à lui plus perméable que l'endothélium continu non fenestré. Le transport passif de l'eau et des molécules étant facilité, la transcytose n'intervient quasiment pas. Les cavéoles sont très peu présentes. La présence d'un diaphragme jouant le rôle de filtre empêche cependant le passage des grosses molécules ainsi que de l'albumine.

L'endothélium discontinu

L'endothélium discontinu est caractérisé par la présence de fenêtres sans diaphragme constituant de véritables trous. L'eau et les grosses molécules peuvent traverser librement la paroi endothéliale. Les cellules endothéliales expriment des clathrines favorisant également un transport impliquant les phénomènes d'endocytose. Cet endothélium, très particulier, n'est retrouvé que dans certaines conditions comme au niveau des sinus hépatiques[13] (Figure 5).

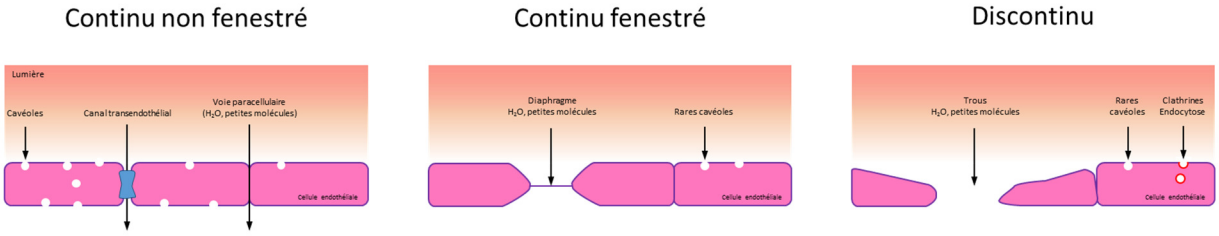


Figure 5 : Les structures de l'endothélium et leur perméabilité.

L'endothélium des artères

Les artères sont revêtues majoritairement d'un endothélium continu non fenestré. Les cellules endothéliales y sont allongées et alignées dans le sens du flux sanguin. Elles sont jointes par des jonctions serrées et participent activement à la régulation de la pression artérielle en sécrétant des médiateurs physiologiques qui peuvent faire varier le tonus vasculaire (voir plus bas). Les embranchements artériels et les grandes courbures sont exposés à un flux pouvant être perturbé et non linéaire entrainant un risque d'inflammation, de coagulation et d'athérosclérose[13,14]. Les cellules endothéliales y sont moins fréquemment en phase de quiescence et participent aux mécanismes de mise en place de ces pathologies. Au niveau moléculaire, les cellules endothéliales artérielles expriment spécifiquement, entre autres, des gènes codant pour la neuropiline 1 (NRP1) et *Delta-like ligand 4* (Dll4), des médiateurs intervenant dans les processus d'angiogenèse[15–17].

CC BY NC ND

L'endothélium des veines

Bien que l'endothélium des veines soit principalement continu non fenestré comme celui des artères, les cellules endothéliales veineuses sont plus petites et plus larges, sans forcément être orientées dans le sens du flux[13,14]. Elles sont également moins épaisses et leurs jonctions peuvent être interrompues par des valves qui permettent d'éviter le reflux en maintenant une circulation uni sens. L'insuffisance valvaire peut conduire à une inflammation des veines ainsi qu'à une stase pouvant mener à une thrombose[18–20]. De plus, lorsque les veines sont soumises à un flux artériel, elles acquièrent des propriétés similaires aux artères. En effet, leur paroi s'en retrouve augmentée, la perméabilité vasculaire y est diminuée et les cellules endothéliales produisent des médiateurs physiologiques artériels tels que le NO[21,22]. La morphologie ainsi que la physiologie des cellules endothéliales s'adaptent en fonction de leur environnement. Ces études ont permis de mettre en évidence l'adaptabilité de l'endothélium grâce notamment aux grandes propriétés de plasticité des cellules endothéliales.

L'endothélium des capillaires

Comme les capillaires sont le principal lieu d'échange de molécules au niveau de la circulation, leur endothélium est plus perméable que celui des artères et des veines grâce à la présence de fenestrations voire de discontinuités. Du fait de la très fine paroi des capillaires, les propriétés de l'endothélium dépendent fortement de leur microenvironnement, c'est à dire des organes avec lesquels ils réalisent les échanges. Au niveau musculaire, l'oxygène, le glucose ainsi que les déchets azotés sont les principales substances échangées. Les capillaires pulmonaires sont majoritairement dédiés aux échanges de dioxygène (O_2) et de dioxyde de carbone (CO_2) gazeux tandis qu'au niveau hépatique, les capillaires représentent les sinus hépatiques et effectuent les échanges entre le sang oxygéné provenant de l'artère hépatique et le sang riche en nutriments provenant de la veine porte. Au niveau rénal, les capillaires glomérulaires constituent le filtre des molécules en fonction de leur taille et de leur charge alors que les capillaires des tubules distaux et proximaux permettent une réabsorption du filtrat glomérulaire[13,14]. Il existe donc une grande hétérogénéité de cellules endothéliales à l'échelle du capillaire.

CC BY NC ND

L'endothélium des tumeurs

Enfin, les cellules endothéliales sont également impliquées dans les phénomènes de vascularisation de tumeurs. Les cellules endothéliales tumorales (CETs), très irrégulières en forme et en taille, constituent dans ce cas l'endothélium tumoral[23]. Celui-ci comporte de nombreuses fenestrations et discontinuités qui sont particulièrement impliquées dans les phénomènes de migration de cellules tumorales ou métastase[23]. La vascularisation tumorale s'effectuant de façon très anarchique, il en résulte une faible irrigation qui permet d'entretenir l'hypoxie au sein de la tumeur. En réponse à cette hypoxie, les cellules tumorales et les CETs vont sécréter en grande quantité des médiateurs pro-angiogéniques tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ainsi que des protéines impliquées dans les processus d'adhésion, de migration, de prolifération et des protéines de dégradation de la matrice. Selon leur localisation, le développement tumoral ainsi que la nature de la tumeur, les CETs peuvent présenter de nombreux phénotypes différents et exprimer de nombreuses protéines différentes[23,24].

Les études récentes des cellules endothéliales ont donc permis de mettre en évidence leur grande hétérogénéité selon leur localisation dans l'arbre vasculaire, remettant ainsi en cause l'image de la quiescence de l'endothélium d'avant les années 2000. Cette hétérogénéité endothéliale ouvre de nombreuses perspectives d'étude de l'endothélium trouvant son application dans les diverses pathologies vasculaires et cancéreuses.

b) Physiologie moléculaire de l'endothélium

L'endothélium permet de maintenir l'homéostasie vasculaire et de réguler le tonus des vaisseaux grâce à la sécrétion de facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs.

Les facteurs vasodilatateurs

Les facteurs vasodilatateurs endothéliaux sont le NO, le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) et les prostaglandines I2 et E2 (PGI2 et PGE2). Le NO est le médiateur physiologique vasodilatateur le plus puissant[1]. Il est produit à partir de la L-arginine par la NO synthase endothéliale (eNOS). Après diffusion dans la cellule musculaire lisse, le NO active la guanylate cyclase soluble (GCs) ce qui entraine une augmentation de la production du guanylate monophosphate cyclique (GMPc). Le GMPc induit une activation de la protéine kinase G (PKG), enzyme permettant une relaxation des cellules musculaires lisses à travers une

CC BY NC ND

hyperpolarisation, une diminution de la concentration calcique intra cytosolique et la déphosphorylation des chaines légères de myosine.

L'EDHF quant à lui ne serait pas une seule molécule mais un groupe de molécules incluant notamment des acides époxyeicosatriénoïques (EETs) qui jouent un rôle important dans la physiopathologie de l'endothélium. En effet, il a été rapporté dans un modèle de souris obèses résistantes à l'insuline que les EETs prévenaient les altérations cardiaques ainsi que la dysfonction endothéliale induite par un régime riche en graisse[25]. L'EDHF comprend également le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le monoxyde de carbone (CO), le sulfure d'hydrogène (H_2S), le peptide natriurétique de type C ainsi que les ions potassiques K^+ [26–28]. Ces molécules peuvent activer les canaux potassiques calcium-dépendant (BKCa) de la membrane plasmique des cellules musculaires lisses conduisant alors à une hyperpolarisation.

Enfin, PGI2 et PGE2, prostaglandines produites par les cyclooxygénases à partir de l'acide arachidonique, peuvent activer son récepteur (IP) au niveau membranaire de la cellule musculaire lisse. Etant couplé à une protéine Gs, l'activation de ce récepteur entraine une activation de l'adénylate cyclase (AC) qui va conduire à une augmentation de la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc, comme le GMPc, induira une relaxation des cellules musculaires lisses par le biais de la PKG.

L'un des principaux régulateurs du tonus vasculaire au niveau endothélial est le « *shear stress* » qui constitue les contraintes de cisaillement. Le *shear stress* est une force de friction exercée sur l'endothélium par le flux sanguin. Ces forces provoquent l'ouverture des canaux calciques de type L situés sur la membrane plasmique des cellules endothéliales induisant une augmentation de la concentration calcique intra cytosolique. L'augmentation du calcium intra cellulaire entraine une activation de la eNOS et par conséquent, une production de NO mais également une activation de la phospholipase A2 (PLA2), le précurseur de l'acide arachidonique ainsi que la production de molécules de l'EDHF telles que l'H_2O_2 par les oxydases. De plus, le *shear stress* induit également une activation des Tyrosine Kinases (TKs) conduisant à une activation de la eNOS indépendamment du Ca^{2+} *via* la voie PI3K/Akt[29–32]. Cette voie calcium indépendante d'activation de la eNOS par le *shear stress* semble majoritaire par rapport à la voie calcium dépendante[29,30,32]. Même si la vasodilatation médiée par le *shear stress* implique principalement le NO, l'endothélium produit de façon permanente les trois facteurs vasodilatateurs.

CC BY NC ND

Par ailleurs, les innervations parasympathiques des artères permettent, après stimulation, un relargage de l'acétylcholine au niveau vasculaire. L'acétylcholine entraine une augmentation de la concentration calcique intra cytosolique après activation du récepteur cholinergique le plus exprimé au niveau endothélial : le récepteur muscarinique de type 3 (M3)[33]. En effet, couplé à une protéine Gq, l'activation de M3 entraine une activation de la PLA2 qui va transformer le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP_2) en inositol trisphosphate (IP_3). Ce dernier agira sur son récepteur au niveau du réticulum endoplasmique et entrainera un relargage du calcium au niveau cytosolique (Figure 6).

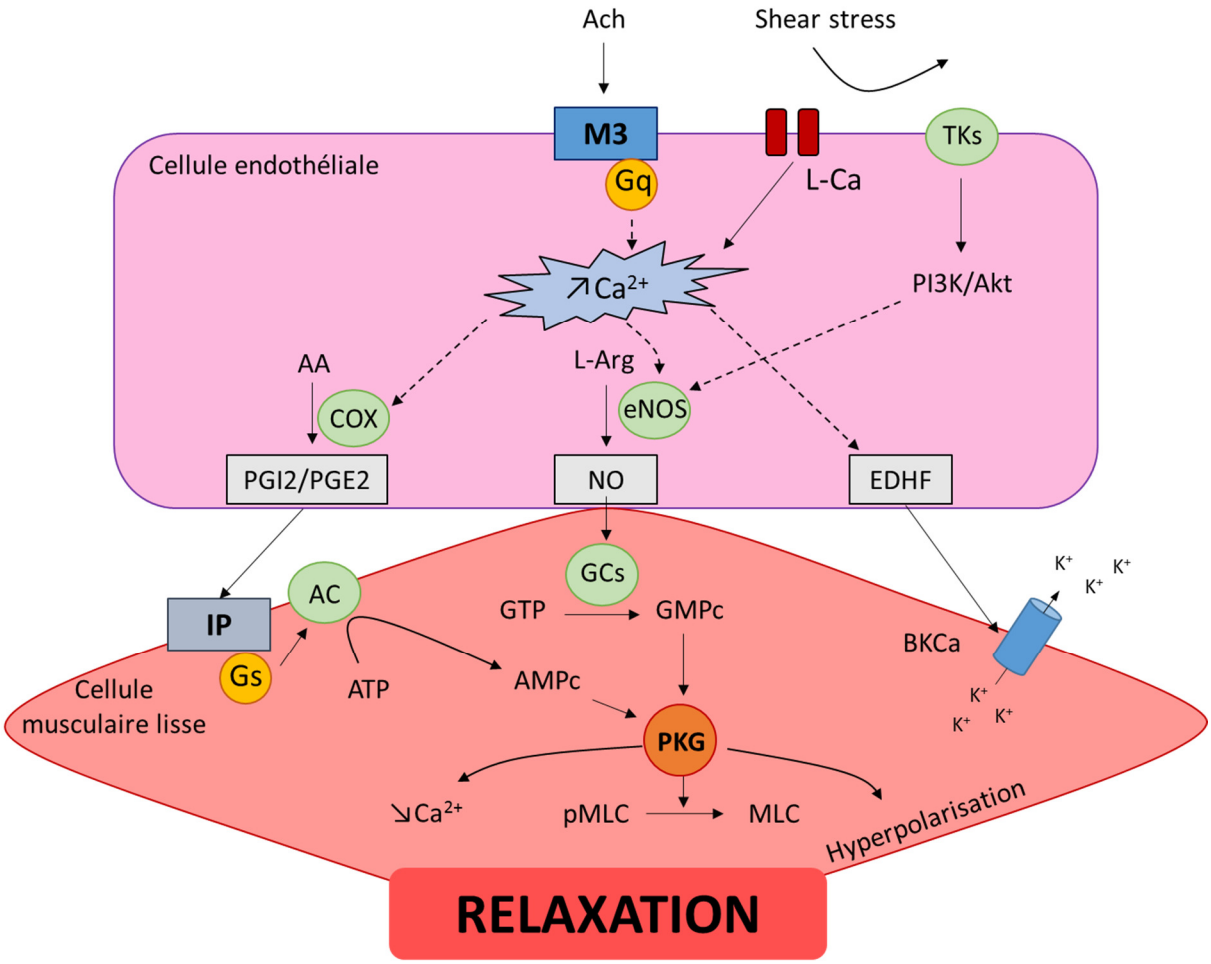


Figure 6 : Voies moléculaires impliquées dans la relaxation des vaisseaux.

CC BY NC ND

Les facteurs vasoconstricteurs

Les cellules endothéliales peuvent également produire des facteurs induisant une contraction comme l'endothéline (ET), le thromboxane A2 (TXA2) et l'uridine adénosine tétraphosphate (UP_4A). Il existe trois isoformes de l'endothéline (ET-1, ET-2, ET-3), petits peptides composés de 21 acides aminés. L'ET est considérée comme le facteur vasoconstricteur physiologique le plus puissant[34,35]. Elle est produite suite à l'activation de son gène au niveau endothélial et peut agir sur ses deux récepteurs ET_A et ET_B, au niveau de la membrane des cellules musculaires lisses des vaisseaux. ET_A et ET_B sont couplés à une protéine Gq. Leur activation entraine une augmentation de la concentration calcique intra cytosolique. Malgré la présence de ET_B au niveau endothélial, entrainant par conséquent une production de NO et de PGI2, l'effet vasoconstricteur est prédominant[36].

Le TXA2 provient du PGH2 qui dérive lui-même de l'acide arachidonique (AA) après oxydation par les cyclooxygénases (COXs). Bien que la prostanglandine H2 (PGH2) soit métabolisée en de nombreuses autres prostaglandines identifiées comme régulant le tonus vasculaire[37], le TXA2 reste la principale prostaglandine vasoconstrictrice[38]. Il agit sur son récepteur (TR, *thromboxane receptor*) au niveau des cellules musculaires lisses qui est couplé à une protéine Gq. Il est produit en réponse à l'ADP et à l'ET-1[38,39].

L'UP_4A est un dinucléotide non peptidique dérivé de l'endothélium qui a été récemment identifié comme ayant un rôle dans la régulation fonctionnelle du tonus vasculaire[40]. L'UP_4A possède à la fois une partie purique et une partie pyrimidique. La contraction qu'il induit est principalement médiée par le purinorécepteur P2X1, même si P2Y2 et P2Y4 sont également suspectés d'être impliqués dans son activité vasoconstrictrice[38,40]. Elle est produite en réponse à de nombreux stimuli comme l'Ach, l'ET-1, l'ATP, l'UTP et le *shear stress*[38].

En plus de ces facteurs, les *reactive oxygen species* (ROS) ont également été identifiées comme jouant un rôle dans les régulations de la vasomotricité physiologique. Les ROS sont générées en permanence durant l'activité métabolique normale. Cependant, leur surproduction peut conduire à un stress oxydant. Les principales ROS intervenant dans les réponses vasoactives de l'endothélium sont l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyl (•OH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Elles sont des sous-produits de la génération des prostaglandines par les COXs, de la eNOS ou encore de la respiration mitochondriale. Elles peuvent directement agir comme des facteurs vasocontractants dérivés de l'endothélium ou potentialiser leurs réponses en diminuant la biodisponibilité du NO et activer les COXs endothéliales[41–44].

CC BY NC ND

Equilibre entre facteurs dérivés de l'endothélium vasodilatateurs et vasoconstricteurs

L'activation physiologique des cellules endothéliales par divers stimuli physiques ou *via* des médiateurs physiologiques conduit à la production simultanée de facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Ces facteurs endothéliaux exercent un effet opposé sur les cellules musculaires lisses. Ils participent au contrôle du tonus vasculaire et par conséquent à la régulation de la pression artérielle. A l'état physiologique, la production de ces différents facteurs est constamment balancée afin de maintenir une pression artérielle stable. L'endothélium, simple couche unicellulaire de la paroi interne des vaisseaux, est donc un organe majeur du système cardiovasculaire jouant un rôle prépondérant dans la régulation de la pression artérielle (Figure 7).

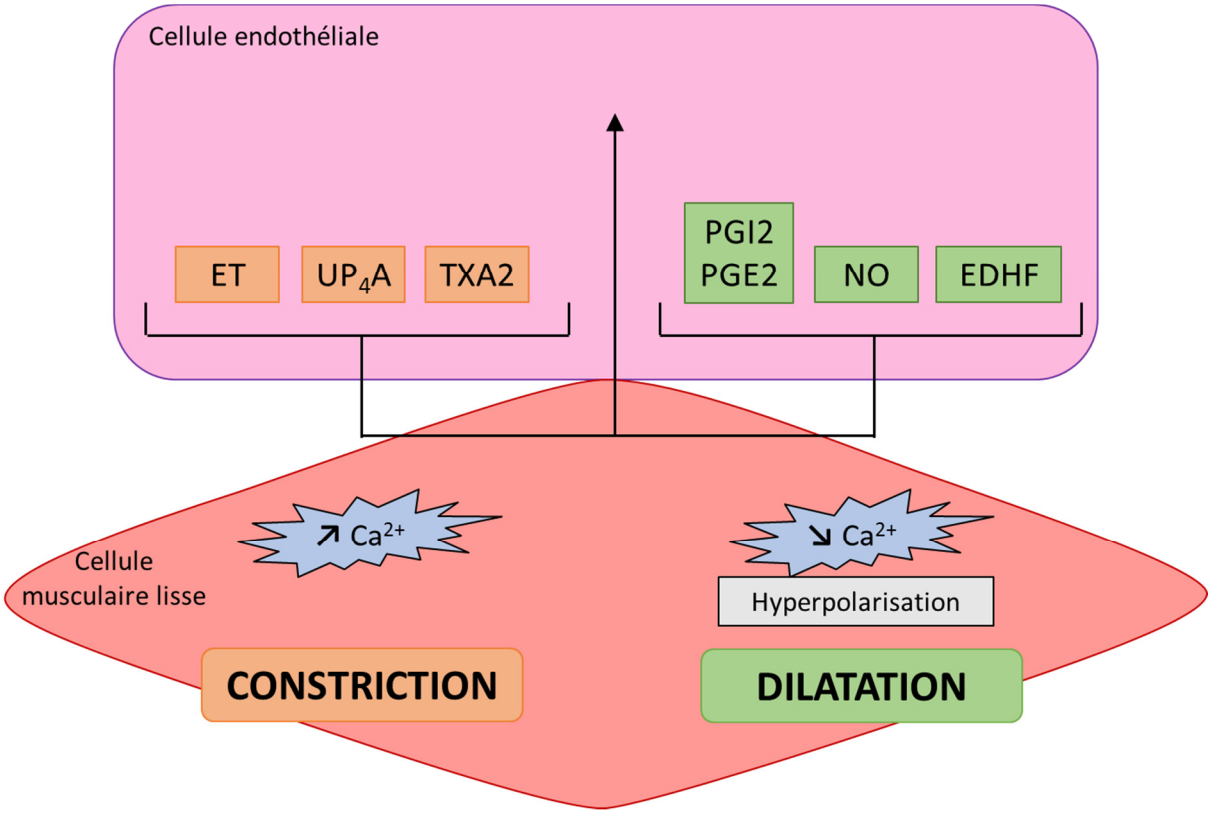


Figure 7 : Equilibre à l'état physiologique entre les facteurs dérivés de l'endothélium vasoconstricteurs et vasodilatateurs.

CC BY NC ND

c) Pathologies liées à l'endothélium

Des dommages causés au niveau des cellules endothéliales peuvent déstabiliser la balance des facteurs dérivés de l'endothélium en faveur des facteurs vasoconstricteurs. Ce déséquilibre peut être dû à une surproduction de facteurs vasoconstricteurs ou à une diminution de la production ou de l'effet des facteurs vasodilatateurs. Ce phénomène a pour conséquence une diminution de la relaxation des vaisseaux induite par l'Ach et est appelé dysfonction endothéliale.

La dysfonction endothéliale est un marqueur précoce devançant l'apparition de pathologies cardiovasculaires. Elle a par exemple été identifiée comme marqueur précoce de l'athérosclérose, une pathologie asymptomatique caractérisée par le dépôt de plaques d'athérome dans les parties intima et media des grosses artères[45–47]. Par ailleurs, les principaux facteurs de risque de maladies cardiovasculaires comme l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le diabète et le tabac sont associés à une dysfonction endothéliale[45,46,48,49]. De plus, la dysfonction endothéliale est corrélée positivement avec les marqueurs classiques de l'inflammation comme la protéine C réactive (CRP) et le peptide cérébral natriurétique (BNP)[50,51].

Ainsi, de nombreuses études montrent une association entre la dysfonction endothéliale et les pathologies cardiovasculaires. Même si certains auteurs décrivent un cycle permettant d'entretenir chacun des deux phénomènes[52,53], les études expérimentales chez l'animal comme chez l'Homme tendent à confirmer un rôle causal de la dysfonction endothéliale plus qu'une conséquence dans les pathologies cardiovasculaires[54].

CC BY NC ND

BY NC ND

DEUXIEME PARTIE : DEET ET ANGIOGENESE

Chez le sujet sain, les cellules endothéliales sont considérées comme quiescentes et sont impliquées dans la régulation de la pression artérielle par la production de médiateurs induisant des effets vasoconstricteurs ou vasodilatateurs. Mais en réponse à certains *stimuli* comme le dépôt de la plaque d'athérome, les dommages tissulaires, l'inflammation ou l'hypoxie, les cellules endothéliales peuvent s'activer et conduire à un remodelage endothélial[55]. Le remodelage endothélial peut mener, grâce à un processus hautement coordonné de germination de cellules endothéliales, à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins[56]. Ce processus est appelé angiogenèse. Dans le cadre de la vascularisation de tumeurs, ce processus est appelé angiogenèse tumorale.

Cette deuxième partie expose dans un premier temps les mécanismes impliqués dans l'angiogenèse tumorale. De nombreuses suspicions sont actuellement évoquées concernant l'association entre une exposition à des molécules présentes dans l'environnement et une augmentation de la croissance tumorale notamment à cause d'un effet pro-angiogénique. En effet, l'exposition à des toxiques environnementaux tels que l'arsenic[57,58], le cadmium[59], le bisphénol A[60] ou encore la chlordécone[61] peut conduire à une activation des processus angiogéniques chez les cellules endothéliales pouvant être responsables d'une augmentation de la croissance tumorale. Durant ce travail de thèse nous nous sommes, entre autre, intéressés à l'effet du DEET, un répulsif anti-moustiques, sur le processus angiogénique. Ainsi, dans un deuxième temps, cette partie fait le point sur la littérature concernant ce répulsif anti-moustiques.

1 - L'angiogenèse

a) Définition

L'angiogenèse se définit comme la naissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. Les vaisseaux formés sont des capillaires constitués d'une monocouche de cellules endothéliales sur lesquels peuvent s'ajouter des cellules musculaires[62]. De façon générale, ce processus apparaît lors de la cicatrisation, lors de l'atteinte oculaire chez le sujet diabétique (rétinopathie diabétique) ou lors de la croissance

CC BY NC ND

tumorale, il s'agit alors d'angiogenèse tumorale. La cellule endothéliale est donc l'acteur majeur du processus angiogénique.

L'angiogenèse se distingue de la vasculogenèse qui est la formation de vaisseaux sanguins *de novo*, à partir de cellules endothéliales progénitrices. La vasculogenèse intervient par exemple au cours de l'embryogenèse[63].

L'artériogenèse, quant à elle, est la formation des artères à partir des capillaires. Elle intervient secondairement à l'angiogenèse ou à la vasculogenèse[64].

b) Voies de signalisation impliquées dans le processus angiogénique

Phase de quiescence

En conditions physiologiques, l'endothélium est en phase de quiescence. Les cellules endothéliales ont une longue durée de vie et participent à la régulation de la pression artérielle, empêchent l'activation plaquettaire et sont dotées de capteurs de la saturation de l'hémoglobine en oxygène afin d'ajuster le flux sanguin en cas d'hypoxie[17].

Au niveau moléculaire, les cellules endothéliales sont liées à la fois à la membrane basale et entre elles par de nombreux complexes d'adhésion. Les deux complexes d'adhésion principaux retrouvés au sein des cellules endothéliales sont les jonctions d'adhérence et les jonctions serrées[65]. Des molécules d'adhésion cellulaires telles que *platelet endothelial cell adhesion molecule* 1 (PECAM-1 ou CD31) participent également aux jonctions endothéliales intercellulaires.

Les jonctions serrées sont principalement composées de claudines, d'occludines et de nectines. Elles permettent un rapprochement des membranes plasmiques des cellules endothéliales, diminuent fortement l'espace inter-membranaire et, par conséquent, la perméabilité endothéliale[65].

Les jonctions d'adhérences quant à elles sont essentiellement constituées de cadhérines de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérines). Les VE-cadhérines sont directement liées en intracellulaire au cytosquelette et sont régulées par des kinases telles que Src, la protéine kinase C (PKC) et la *focal adhesion kinase* (FAK), par des facteurs de croissance comme le VEGF ainsi que par les petites GTPases de la famille de Rap et de Rho[66]. Tous ces médiateurs interviennent donc dans la régulation des jonctions d'adhérence et par conséquent dans l'adhésion et la perméabilité endothéliale.

CC BY NC ND

La régulation des fonctions d'adhésion endothéliale est un phénomène dynamique et complexe qui n'intervient en phase de quiescence que lors du renouvellement naturel des cellules endothéliales mais qui est largement activé pendant les différentes phases de l'angiogenèse.

Switch angiogénique

Lors de la croissance des tumeurs solides, l'apport de nutriments et d'oxygène est indispensable pour que les cellules tumorales puissent continuer de se multiplier. La tumeur nécessite donc d'être vascularisée si elle veut éviter de rester en état d'hypoxie. Ainsi, en réponse à cette hypoxie mais également à l'inflammation liée au microenvironnement tumoral, les cellules tumorales vont sécréter des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, l'angiopoiétine (ANG) le *fibroblast growth factor* (FGF) et des chimiokines[17]. Ces facteurs pro-angiogéniques constituent un véritable stimulus pour les vaisseaux qui permet de déclencher les premières étapes de l'angiogenèse. Cette phase est appelée « switch angiogénique ».

Augmentation de la perméabilité endothéliale

En réponse à ce stimulus angiogénique, ce sont les macrophages associés à la tumeur qui vont, dans un premier temps, sécréter des métalloprotéinases de la matrice (MMPs)[67]. Celles-ci vont permettre le détachement des péricytes de la membrane basale et de l'endothélium. La libération des MMPs va également induire une perte des jonctions serrées et d'adhérence des cellules endothéliales[68]. La perméabilité vasculaire est alors augmentée conduisant, notamment avec la vasodilatation induite par le VEGF, à une extravasation plasmatique qui formera une matrice extracellulaire (MEC). Cette MEC contiendra les facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les cellules environnantes et constituera un milieu micro environnant pro-angiogénique également appelé angio-compétent[17]. La composition du milieu angio-compétent évoluera au fur et à mesure de l'avancée du processus angiogénique (Figure 8).

Recrutement de la cellule distale (tip cell)

Les cellules endothéliales migrent vers ce milieu angio-compétent et dans un souci de réalisation harmonieuse, une seule cellule endothéliale va être sélectionnée afin d'initier le bourgeonnement du capillaire[17]. Cette cellule est appelée cellule distale ou *tip cell* et comporte de nombreux prolongements de type filopodes. D'un point de vue moléculaire, la sélection de la *tip cell* s'effectue d'abord après stimulation du récepteur au VEGF de type 2 (VEGFR2) par

cc BY NC ND

le VEGF de type A. Cette activation entraine au sein de cette cellule, d'une part, l'activation de la glycolyse par augmentation de l'expression de la 6-PhosphoFructose-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphate 3 (PFKFB3) et d'autre part, l'augmentation de l'expression de Dll4, le ligand du récepteur Notch. Il y aurait très certainement une diffusion de Dll4 de la *tip cell* vers les cellules endothéliales voisines entrainant une activation de la voie de signalisation Notch. Cette activation de Notch induit alors une diminution de l'expression de PFKFB3 par l'intermédiaire du domaine intracellulaire Notch 1 (NICD1), donc une diminution de la glycolyse chez les cellules voisines de la *tip cell*[69–71]. Ces cellules formeront les cellules d'élongation du capillaire ou *stalk cell* (Figure 8 et 9).

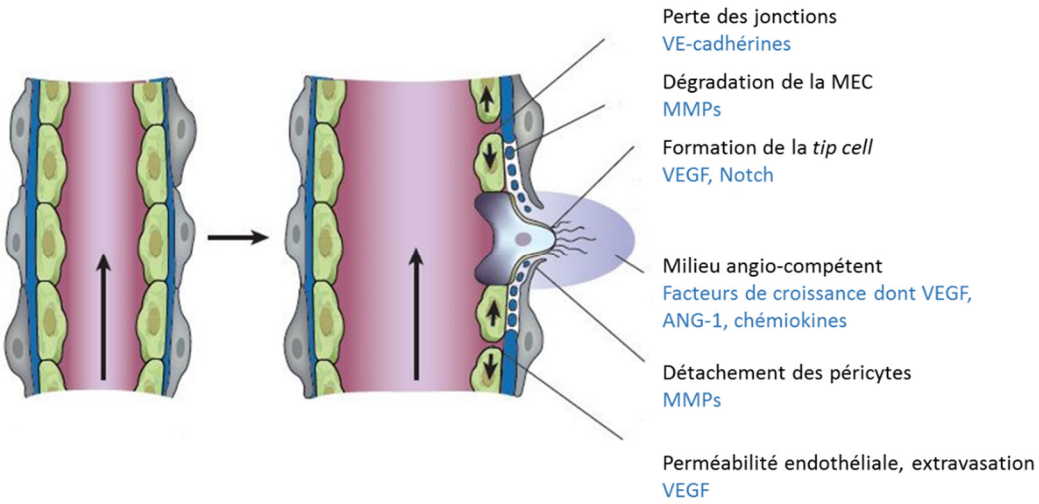


Figure 8 : Switch angiogénique et sélection de la *tip cell* (adapté à partir de Carmeliet P et Jain K (2011) *Nature*).

CC BY NC ND

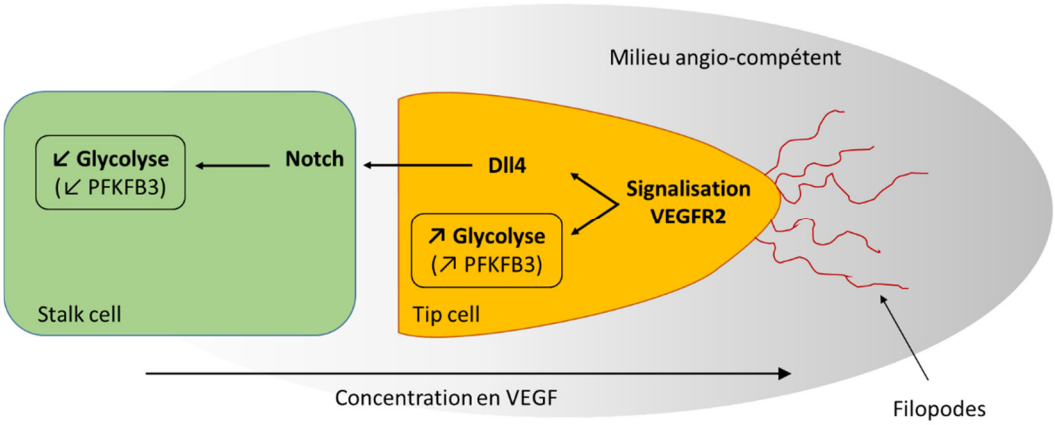


Figure 9 : Mécanismes de différenciation des cellules endothéliales en *tip cell* et *stalk cell* lors du bourgeonnement angiogénique.

La différenciation des cellules endothéliales en *tip cell* ou *stalk cell* fait intervenir en premier lieu le VEGF. La voie de signalisation Notch intervient ensuite entrainant une différence d'activité de la glycolyse, plaçant ainsi le métabolisme glucidique au cœur du processus de bourgeonnement angiogénique[69–71].

Elongation et formation du capillaire

Les cellules voisines de la *tip cell*, sous l'influence de la voie de signalisation Notch notamment, se différencient en *stalk cells*. Ces *stalk cells* vont alors pouvoir se diviser et s'aligner derrière la *tip cell* de façon à former une lumière, et à participer à l'élongation du capillaire. Ces comportements cellulaires sont régis au niveau moléculaire par les voies de signalisation Notch, WNT-Frizzled, Hedghog et des facteurs de croissance tels que le VEGF, le *placenta growth factor* (PlGF) et le FGF ainsi que le NO[17,72]. L'élongation du capillaire va entrainer une hypoxie endothéliale notamment pour les cellules distales. Celles-ci vont alors activer la voie de l'*hypoxia inducible factor 1α* (HIF-1α) qui va entretenir le processus angiogénique au niveau endothélial. Les cellules myéloïdes présentes à proximité du milieu angio-compétent vont élaborer un pont entre la *tip cell* et un capillaire qui finalisera l'élongation du capillaire[73,74]. Ceci entrainera l'initiation de la circulation sanguine au sein du capillaire et mettra fin à l'environnement hypoxique[17] (Figure 10).

Les étapes du processus angiogénique font donc intervenir des propriétés d'adhésion et de migration des cellules endothéliales. Ces mécanismes cellulaires sont indispensables pour l'élongation et la formation du capillaire nouvellement formé. Au niveau endothélial, les

CC BY NC ND

protéines régulant l'adhésion et la migration sont activées. Ainsi, des protéines telles que FAK, RhoA et Akt peuvent être phosphorylées et/ou augmentées. Les filaments d'actine vont également jouer un rôle prépondérant dans la mobilité endothéliale en s'associant entre eux et en se liant aux intégrines pour former des fibres de stress. Les processus d'adhésion et de migration sont donc hautement coordonnés et régulés par de nombreuses voies cellulaires lors de l'angiogenèse.

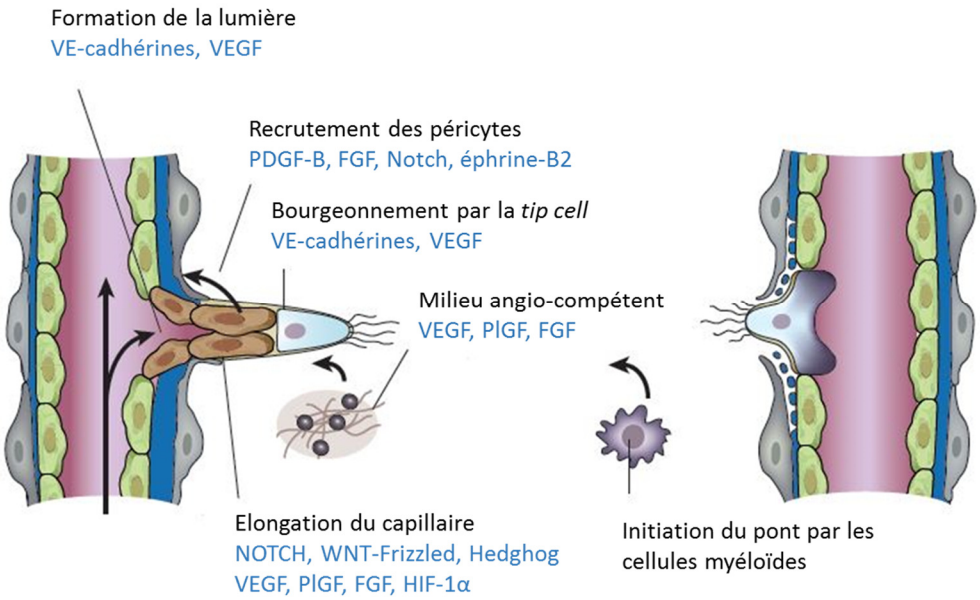


Figure 10 : Elongation du capillaire nouvellement formé (adapté à partir de Carmeliet P et Jain K (2011) *Nature*).

Maturation et maintien de la quiescence du capillaire nouvellement formé

Une fois la jonction effectuée et la circulation sanguine établie, les péricytes vont venir se déposer autour des cellules endothéliales de façon à stabiliser le capillaire. Ce phénomène est médié par la présence de facteurs de croissance tels que le *platelet-derived growth factor* B (PDGF-B), le *transforming growth factor* β (TGF-β), mais également par l'éphrine-B2, l'ANG-1 et la voie de signalisation Notch[17]. Puis, sous l'influence du *tissue inhibitor of metalloproteases* (TIMPs) et du *plasminogen activator inhibitor* 1 (PAI-1) la membrane basale ainsi que les jonctions inter cellulaires vont progressivement se mettre en place[17] (Figure 11).

CC BY NC ND

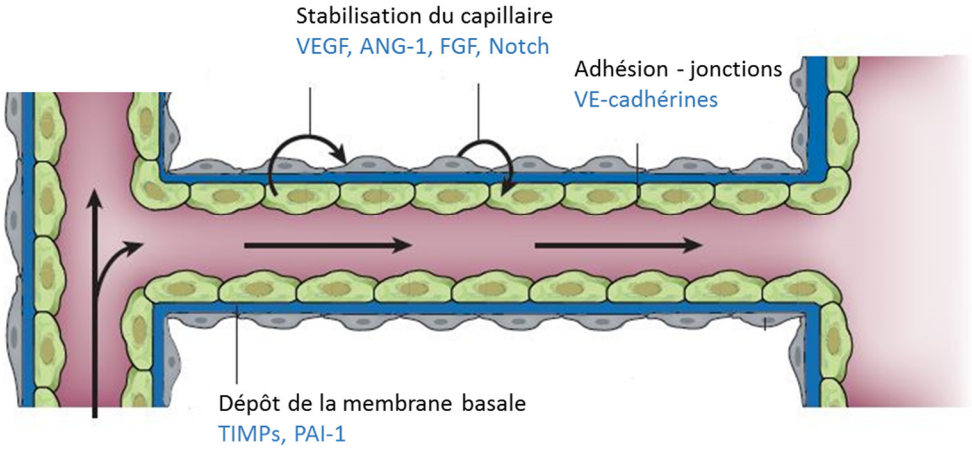


Figure 11 : Stabilisation et maturation du capillaire (adapté à partir de Carmeliet P et Jain K (2011) *Nature*).

L'angiogenèse, à travers le bourgeonnement et l'élaboration de capillaires est donc un phénomène complexe hautement coordonné faisant intervenir de nombreuses voies de signalisation et processus cellulaires comme l'adhésion, la migration et la prolifération endothéliale. Outre ces protéines et voies de signalisation spécifiques de l'angiogenèse, de nombreux autres médiateurs ont été identifiés comme jouant un rôle dans la régulation des processus angiogéniques comme, par exemple, la CRP monomérique[75], une protéine de l'inflammation ; le glucagon[76], une hormone peptidique intervenant dans le métabolisme glucidique ; les micro-RNA[77,78] ou encore PTP1B, une tyrosine phosphatase[79,80]. En effet, il a été montré chez la souris que la délétion de PTP1B, qu'elle soit totale comme spécifiquement endothéliale, permettait de faciliter l'activation du VEGFR2, participant ainsi, d'une part, à l'amélioration de la perfusion cardiaque en post-infarctus, et d'autre part, à la cicatrisation[79,80].

CC BY NC ND

2 - le *N*,*N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET)

Comme énoncé plus haut, cette deuxième partie fait un état des lieux des connaissances actuelles concernant le DEET.

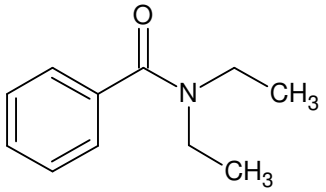
a) Propriétés physico-chimiques

Le DEET (CAS : 134-62-3), de formule brute $C_{12}H_{17}NO$ (Figure 12) et de poids moléculaire 191,3 g/mol est un liquide incolore, pratiquement inodore, peu soluble dans l'eau (≈ 2µg/ml) mais soluble dans de nombreux solvants organiques tels que l'éthanol, le méthanol et l'éther[81,82]. Son coefficient de partage octanol/eau (Log K_{ow}) est compris entre 2,02 et 2,40 et il a une relativement faible pression de vapeur comprise entre 0,00013 et 0,0017 mmHg à 25°C[81,82]. Le DEET a la particularité de solubiliser les matières plastiques.

b) Historique

L'émergence des répulsifs anti-moustiques est apparue juste après la Seconde Guerre Mondiale. En effet, la forte exposition aux maladies vectorielles des militaires américains déployés dans la zone Asie-Pacifique en 1941 les a obligés à prendre des mesures de protection contre ces pathologies. En l'absence de traitement, la prévention des piqûres de moustiques restait et reste encore la meilleure solution. Le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), un insecticide issu de la synthèse organique, a été largement utilisé par les soldats américains durant cette période notamment du fait de son importante efficacité[83,84]. En parallèle, le Département de l'Agriculture des USA lançait un programme pour la recherche de nouveaux répulsifs anti-moustiques. Après un criblage de plus de 7 000 composés, la structure de type *N,N*-diéthylbenzamide a été identifiée comme ayant un effet répulsif sur les moustiques[85]. Cependant, ce composé induit des irritations cutanées ne permettant pas une utilisation chez l'Homme[85]. Sur la base de ce pharmacophore, 33 dérivés ont été synthétisés et testés. Ainsi, en 1946, le *N*,*N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) a été identifié comme composé exerçant une forte répulsion contre les moustiques sans occasionner d'irritation cutanée[83–85].

CC BY NC ND



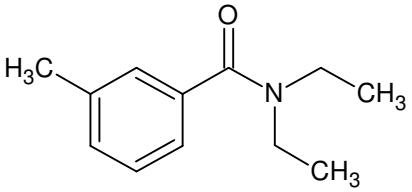


Figure 12 : Structures moléculaires du *N,N*-diéthylbenzamide (à gauche) et du DEET (à droite)

D'abord réservé pour un usage militaire, le DEET a ensuite été mis sur le marché pour la population générale aux Etats-Unis en 1957. Ce produit se présentait sous une forme liquide contenant du DEET à une concentration de 75% en solution éthanolique. Cependant, le DEET solubilise les matières plastiques et est ainsi responsable d'altérations de textiles synthétiques ou d'accessoires tels que des bracelets de montre, des lunettes, des élastiques etc… De plus, sous un climat chaud et humide, ce qui est souvent le cas dans les régions endémiques des maladies vectorisées par les moustiques, son efficacité est réduite du fait de son évaporation et il procure une sensation huileuse sur la peau ainsi qu'une odeur désagréable[83,84]. Devant ces inconvénients d'utilisation, et dans l'incapacité de trouver d'autres composés répulsifs d'efficacité comparable, le Département de la Défense des Etats-Unis, en collaboration avec la compagnie 3M, lance dans les années 1990 un programme de développement d'une nouvelle forme galénique du DEET[86]. Grâce à l'utilisation d'un polymère de type cellulose, cette société a mis au point une formulation permettant de limiter l'évaporation du DEET, augmentant ainsi sa durée d'action et permettant, de surcroît, d'en diminuer la concentration. De plus, cette forme galénique diminue l'absorption cutanée du DEET, ne possède plus de sensation huileuse ni d'odeur désagréable et améliore l'effet « water proof »[86]. Ce produit est toujours utilisé par les militaires et est commercialisé aujourd'hui sous le nom Ultrathon®. Il contient du DEET à 33%.

c) Utilisation, produits commercialisés et réglementation

Aujourd'hui, plus de 200 millions de personnes utilisent des répulsifs à base de DEET ce qui représente entre 2 300 et 3 300 de tonnes de DEET libéré chaque année dans l'environnement[81,87]. Dans le monde, plus de 220 produits contenant du DEET sont commercialisés. Les produits commercialisés en France ne contiennent pas plus de 50 % de

cc BY NC ND

DEET alors qu'il est possible de trouver des produits en contenant plus de 90 % dans d'autres pays tels que les Etats-Unis.

Les principaux produits contenant au moins 20 % de DEET et commercialisés en France sont répertoriés dans le tableau 1. L'OMS conseille d'utiliser des produits contenant du DEET à au moins 30 % afin de s'assurer d'une bonne efficacité répulsive contre les moustiques. Cependant, les enfants ainsi que les femmes enceintes ne doivent pas utiliser des produits contenant du DEET à plus de 30 % à raison de 1 et 3 applications par jour maximum respectivement. Les recommandations suivantes sont issues du bulletin épidémiologique hebdomadaire du 9 juin 2015 et présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Recommandations françaises pour l'utilisation des produits à base de DEET.

		Nombre maximal d'application selon l'âge				
Concentration DEET	Nom commercial	A partir de 6 mois	De 6 mois à 2 ans	De 2 ans à 12 ans	Plus de 12 ans	Femmes enceintes
20 %	King® gel insectifuge Mousticologne®	1	2	2	3	3
25 %	Insect écran® famille	1	2	2	3	3
30 %	Moustidose® lotion répulsive Moustifuid® zones à hauts risques Prébutix® zone tropicale Mouskito travel®	1	2	2	3	3
34 %	Ultrathon® Bushman®	X	X	X	3	X
40 %	Moustidose®	X	X	X	3	X
50 %	Insect écran® zones infestées Biovectrol® tropique Repel insect®	X	X	X	3	X

D'un point de vue réglementaire, le DEET, en tant que répulsif, fait partie de la famille des biocides. Les biocides sont des substances ou des préparations destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière, par une action chimique ou biologique. Ces biocides sont régis par le règlement européen UE N°528/2012 du 22 mai 2012 relatif à leur mise à disposition sur le marché et à leur utilisation et applicable depuis le 1er septembre 2013. Ils sont classés en

CC BY NC ND

22 types qui sont eux même rassemblés en 4 groupes principaux : les désinfectants, les produits de protection (du bois, des plastiques, des fibres…), les produits de lutte contre les nuisibles et les autres produits biocides (produits utilisés pour l'embaumement ou les produits antisalissure). Le DEET appartient au groupe 3 des produits de lutte contre les nuisibles et au type 19 qui inclut les répulsifs et appâts. Désormais, en France, tous les produits contenant du DEET doivent recevoir une autorisation de mise sur le marché (AMM) délivrée par le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie.

d) Cibles du DEET chez le moustique et mécanisme d'action

Il est clairement démontré que le DEET est à l'heure actuelle le répulsif le plus efficace contre de nombreux vecteurs tels que les moustiques du genre Anophèle, Aedes ou Culex, les Phlébotomes, les mouches, les punaises voire même les tiques[88–90]. Malgré cela, son mécanisme d'action n'a pas encore été totalement élucidé.

Afin de comprendre comment le DEET exerce une répulsion chez les insectes, il est nécessaire au préalable de comprendre comment les insectes sont attirés par les hôtes humains. En effet, la totale compréhension de l'attraction du moustique pour l'homme permettra de fournir les éléments nécessaires non seulement pour identifier le mécanisme d'action du DEET mais également pour trouver de nouveaux répulsifs anti-moustiques.

Ainsi, outre la chaleur dégagée par le corps, plusieurs effecteurs ont été identifiés comme étant responsables de l'attraction des moustiques dont principalement le CO_2, l'acide lactique, l'acétone, et le 1-octen-3-ol. Tous ces effecteurs constituent des signaux qui sont détectés par le système olfactif des moustiques. Celui-ci joue donc un rôle essentiel pour l'orientation et la détection de l'hôte par le moustique.

Les neurones du système olfactif du moustique sont situés au niveau des antennes et possèdent plusieurs familles de récepteurs dont les récepteurs odorants (ORs) et les récepteurs ionotropes (IRs). Le DEET a été identifié comme pouvant interagir avec certains de ces récepteurs et induire une perturbation du message nerveux olfactif déclenché par les différents effecteurs attractants et ainsi provoquer une répulsion plutôt qu'une attraction. Parmi les ORs et ses corécepteurs, il a été rapporté que la présence de OR59b, OR2, OR83b ainsi que de OR136 était indispensable pour que le DEET, lorsqu'il est dans l'air à l'état de vapeur, puisse exercer son effet répulsif[91–94]. Cependant, il a été remarqué dans ces études que le DEET était nettement plus efficace lorsqu'il était associé aux odeurs humaines plutôt qu'utilisé seul[85]. Malgré le fait que de nombreux récepteurs ainsi que de nombreuses voies olfactives aient été

CC BY NC ND

identifiées, l'interaction du DEET avec les ORs pour changer le comportement des moustiques fait actuellement l'objet de nombreuses investigations[85]. Trois hypothèses sont actuellement envisagées, selon lesquelles le DEET, en agissant sur le système olfactif, induirait un état de confusion et de désorientation chez le moustique. Il provoquerait également une répulsion à travers un comportement d'évitement, le moustique cherchant ainsi à fuir la zone contenant du DEET. Enfin, le DEET pourrait, en perturbant le système olfactif, inhiber la capacité des moustiques à sentir les odeurs corporelles[85,95]. Malgré le fait que plusieurs cibles aient été identifiées, les perturbations comportementales induites par le DEET à travers le système olfactif du moustique restent à ce jour encore inexpliquées.

De façon plus anecdotique, le DEET agit également sur la voie de signalisation activée par l'acide lactique. A ce jour, le récepteur à l'acide lactique chez le moustique n'a pas encore été identifié mais il avait été mis en évidence, il y a plusieurs dizaines d'années maintenant, que le DEET diminuait l'excitation des neurones induite par l'acide lactique[96]. Cet effet participerait également à l'activité répulsive du DEET.

Enfin, les études s'intéressant au contact direct entre le DEET et les insectes ont montré que le DEET possédait une activité répulsive ainsi qu'une activité anorexigène. En effet, il a été remarqué que les moustiques ne se nourrissaient pas de sang contenant du DEET à 0,065% (soit environ 3.10^{-3} M)[85]. Par la suite, les modifications génétiques de la drosophile ont ainsi permis d'identifier trois récepteurs gustatifs (GRs) responsables de l'activité du DEET : GR32a, GR33a et GR66a[97]. Cette particularité du DEET à agir comme « coupe faim » dépend donc uniquement du système gustatif et non olfactif.

Outre les systèmes olfactifs et gustatifs, le DEET a également été identifié comme étant un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AchE) et cet effet était associé à un effet insecticide après 1 heure de contact avec un papier imprégné à une concentration de 15 % de DEET[98]. Le DEET ne serait donc pas un simple répulsif mais pourrait également être considéré comme un insecticide. De plus, le DEET a également été identifié comme pouvant agir sur les récepteurs muscariniques de type 1 et 3 (M1/M3) des moustiques[99]. Ainsi, le système périphérique serait, en plus du système nerveux central, également une cible du DEET chez l'insecte. Ce mode d'action multi cible explique en grande partie la très grande efficacité du DEET, jamais égalée par d'autres composés répulsifs jusqu'à présent. Ceci est d'autant plus important que la majorité de ces cibles sont considérées comme stables génétiquement ce qui limiterait les mutations de leurs gènes respectifs et donc les résistances des insectes au DEET[91–94,97,100].

CC BY NC ND

Malgré des recherches intenses et l'identification de plusieurs récepteurs, de nombreuses questions restent encore en suspens concernant l'activité répulsive du DEET sur les insectes. La réponse à ces questions permettrait non seulement de mieux maîtriser cette molécule mais également d'offrir de nouvelles opportunités pour la recherche d'autres répulsifs.

e) Mésusage, environnement, exposition et résistance des insectes

Du fait à la fois de son importance dans la lutte anti-vectorielle et de sa grande facilité d'accès, le DEET est très utilisé par la population générale. Il en résulte inévitablement un mésusage voire une utilisation dérivée.

Au Canada, le DEET a déjà été appliqué sur le bétail afin de prévenir les piqûres causées par les ectoparasites et les insectes hématophages[101–103]. Plus récemment, en Suisse, l'efficacité du DEET a été démontrée sur des chevaux afin de prévenir les piqûres d'insectes hématophages sur ces animaux[104]. Il a également été suggéré de répandre du DEET dans les aires agricoles pour éviter les ravages causés par les insectes sur les cultures et de l'utiliser afin d'éloigner les insectes des lieux tels que les fosses septiques, les stations d'épuration et les aires de jeu pour enfants comme les cours de récréation[105].

L'utilisation du DEET ne se limite donc pas uniquement aux régions endémiques des maladies vectorielles. Les répulsifs anti-moustiques sont utilisés partout dans le monde, que ce soit pour la prévention des pathologies transmises par les vecteurs comme pour le confort et l'évitement des piqûres d'insectes. A titre d'exemple, environ 30 % de la population américaine s'applique du DEET au moins une fois par an[106].

La très grande utilisation de ce répulsif induit inévitablement une pollution environnementale. Le DEET est la molécule la plus fréquemment retrouvée dans l'environnement que ce soit en Europe[107,108], en Asie[109], en Amérique[110,111] ou en Australie[112] parmi les médicaments, les insecticides et les polluants organiques persistants. Une revue de la littérature a d'ailleurs permis d'estimer que la concentration moyenne en DEET dans l'environnement à l'échelle mondiale s'élevait à 10^{-8} M[87].

Malgré un mécanisme multi cible ainsi qu'une stabilité génétique des cibles du DEET chez les insectes permettant de limiter les résistances, de plus en plus d'études décrivent l'apparition de résistances des insectes face au DEET. Des mouches et des moustiques insensibles au DEET ont d'ailleurs été sélectionnés, à l'échelle du laboratoire, après exposition au DEET[113–115]. L'exposition continue des insectes au DEET notamment par la présence quasi

CC BY NC ND

permanente de cette molécule dans l'environnement pourrait donc participer à l'émergence de résistances. Afin d'éviter ces résistances, il serait nécessaire de reconsidérer l'usage des répulsifs en favorisant par exemple l'association de plusieurs molécules, à l'image des traitements en antibiothérapie. La découverte de nouvelles molécules répulsives ainsi que la compréhension des mécanismes de répulsion des molécules existantes chez les insectes permettront de fournir les éléments nécessaires afin de parer l'émergence des résistances et de poursuivre la prévention des maladies vectorielles.

f) Pharmacocinétique du DEET chez l'Homme

Même si ce n'est pas l'effet recherché, une fois appliqué sur la peau, le DEET peut traverser la barrière cutanée et gagner la circulation générale avec un taux d'absorption variant de 5,6 à 8,3 %[116]. Selon la quantité appliquée, la concentration du produit et la surface corporelle exposée, la concentration plasmatique en DEET peut atteindre 5.10^{-6} M à 10^{-5} M avec un pic plasmatique compris entre 3 et 6 heures[116,117]. Le taux d'absorption peut varier selon la température et le taux d'humidité extérieur, la formulation galénique et notamment les solvants utilisés ainsi que l'application concomitante d'autres produits par voie cutanée tels que les écrans solaires[116,118–125]. Il est ainsi recommandé d'appliquer les écrans solaires en premier et d'attendre 30 minutes avant d'appliquer un répulsif à base de DEET.

Peu d'études se sont intéressées à la distribution du DEET chez l'Homme après exposition cutanée. Toutefois, lors d'une étude réalisée aux Etats-Unis sur 150 femmes enceintes ayant accouché par césarienne, les dosages de DEET dans le sang des cordons ombilicaux ont montré sa présence dans 100 % des échantillons[126]. Le DEET peut donc passer la barrière placentaire et potentiellement mener à une exposition fœtale.

La majorité du DEET absorbé subissant un métabolisme hépatique, une faible proportion de la quantité de DEET absorbé est retrouvée sous forme inchangée dans les urines[127]. Le métabolisme hépatique fait intervenir à la fois l'oxydation et la N-dééthylation *via* les cytochromes P450 (CYP) 2A6, 2C19 3A4 pour l'oxydation et CYP 1A2, 3A5, 2B6, 2D6 et 2E1 pour la *N*-dééthylation[128]. Ainsi, le *N*-éthyl-*m*-toluamide (ET), le *N*-éthyl-*m*-hydroxyméthylbenzamide (EHMB), l'acide *m*-(éthylaminocarbonyl)-benzoïque (EACBA), le *N*,*N*-diéthyl-*m*-hydroxyméthylbenzamide (BALC) et l'acide *m*-(diéthylaminocarbonyl)-benzoïque (DACBA) peuvent être retrouvés dans le sang et les urines après exposition au DEET[128]. Le métabolisme hépatique du DEET est représenté par le schéma ci-dessous (Figure 13).

CC BY NC ND

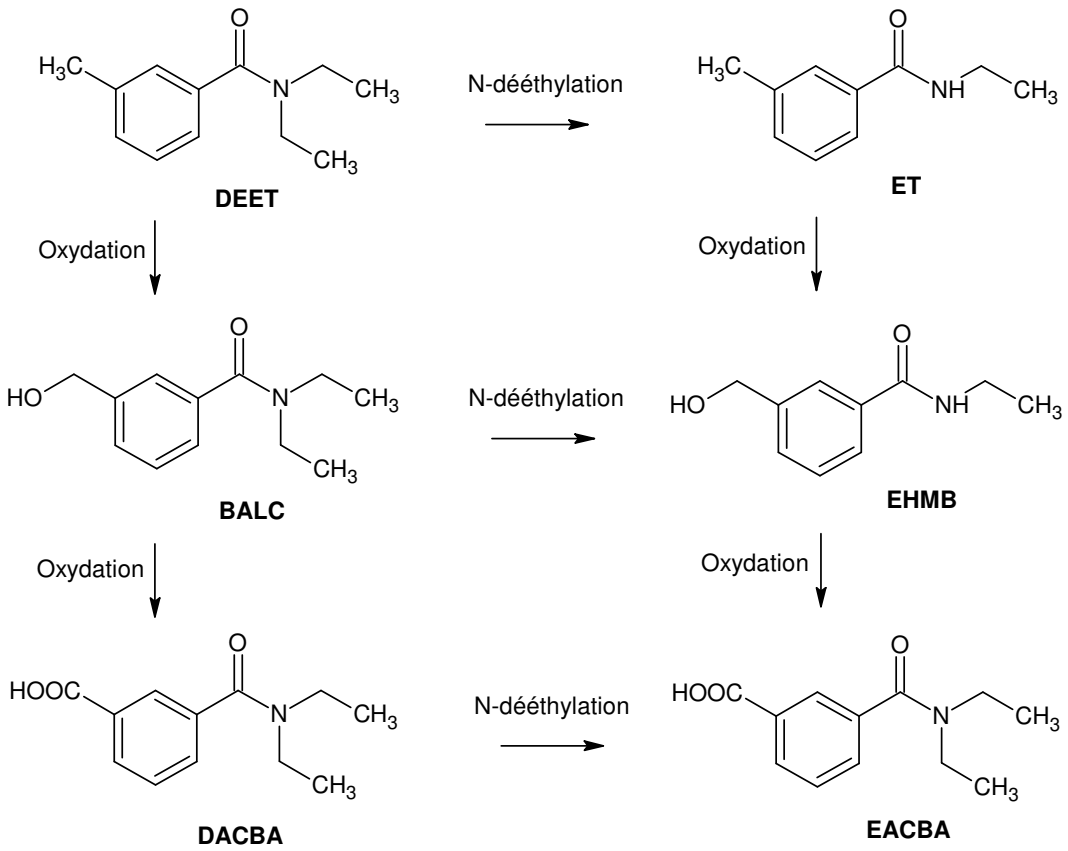


Figure 13 : Métabolisme primaire hépatique du DEET.

Plus de 90 % du DEET est éliminé par excrétion rénale. Aucun temps de demi-vie plasmatique ($t_{1/2}$) n'est rapporté chez l'Homme. A titre d'indication, la $t_{1/2}$ du DEET chez l'animal varie entre 2,73 heures et 6,02 heures selon les espèces[101,118,122,129]. Il est tout de même surprenant de remarquer que malgré l'importante utilisation de ce répulsif à travers le monde, peu de données soient disponibles concernant ses paramètres pharmacocinétiques chez l'Homme.

g) Effets indésirables des répulsifs à base de DEET

Comme décrit précédemment, le DEET est sur le marché depuis les années 1960 et plusieurs centaines de millions de personnes l'utilisent chaque année. Il apparait donc évident que son application cutanée, dans le respect des conditions d'utilisation recommandées par le fabricant, présente peu de risque. Néanmoins, le DEET n'est pas dénué d'effets indésirables.

Deux articles dans la littérature ont répertorié les cas d'exposition au DEET à partir des bases de données des centres antipoison des Etats-Unis[130,131]. D'après ces études, les effets indésirables sont majoritairement constatés chez les enfants (2/3 des cas). Ceci résulte d'une

CC BY NC ND

application trop fréquente du DEET et/ou d'une voie d'exposition autre que cutanée telle que l'ingestion, l'inhalation, le contact oculaire ou une exposition par voies multiples. Dans tous les cas de surexposition au DEET, 30 % étaient symptomatiques dont la majorité étaient liés à une exposition oculaire soulignant le caractère irritant de cette molécule. Même si les cas d'exposition intentionnelle sont assez rares (1 % environ), l'exposition en grande quantité au DEET peut être fatale[130–132].

L'atteinte cutanée est l'effet indésirable le plus fréquemment retrouvé après application du DEET. Celle-ci peut se manifester sous la forme de rash cutané, de lésions, de démangeaisons, d'inflammation se traduisant par des rougeurs et des œdèmes ou de l'urticaire[133,134]. A des doses supérieures, le DEET entraine des nausées, des vomissements et une tachycardie[135]. Une cardiotoxicité a également été décrite avec une hypotension et une augmentation de l'intervalle QT à l'électrocardiogramme (ECG)[136,137]. Le DEET est également responsable d'atteintes du système nerveux central (SNC) pouvant se traduire par des crises convulsives, des confusions, des psychoses, une ataxie, une désorientation, une encéphalopathie[133,135]. Ces atteintes du SNC sont plus fréquemment retrouvées chez les enfants[133,135]. L'utilisation du DEET chez les enfants requiert donc une attention particulière notamment pour le respect des doses et des fréquences d'application.

Enfin, dans les effets indésirables suite à une exposition au long terme, une étude a mis en évidence une association entre une augmentation du risque d'être atteint de cancer des testicules et une exposition chronique au DEET (> 115 jours)[138]. Par ailleurs, il a également été montré que l'exposition concomitante de DEET et des herbicides ou insecticides tels que le Dicamba ou le 2,4D augmentait le risque d'être atteint de cancer par rapport à l'exposition à ces herbicides ou insecticides seuls[139]. Ces études sont les deux seules études publiées s'étant intéressé à l'association entre l'exposition chronique au DEET chez l'Homme et le risque d'être atteint de cancer. Chez l'animal, l'exposition par voie orale de souris mâles et femelles jusqu'à 1 g/kg/jour pendant 18 mois, de rats mâles et femelles jusqu'à 400 mg/kg/j pendant 24 mois et de chiens mâles et femelles à 400 mg/kg/jour pendant 12 mois n'ont pas mis en évidence d'effet carcinogène du DEET[140]. Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de confirmer ces résultats qui restent pour l'instant à considérer avec prudence. Le DEET est classé comme composé probablement non carcinogène pour l'Homme (classe 4) par le centre de recherche international sur le cancer (CIRC). Une évaluation plus approfondie de l'effet du DEET dans le développement tumoral chez l'animal comme chez l'Homme permettrait de fournir les

cc BY NC ND

éléments nécessaires afin de définir le périmètre de la toxicité de ce répulsif et par conséquent, de mieux maîtriser son utilisation.

h) Cibles du DEET identifiées chez l'Homme

Après avoir traversé la barrière cutanée et s'être retrouvé dans la circulation générale, le DEET peut interagir avec différents récepteurs et ainsi interférer avec différentes voies pharmacologiques chez l'Homme.

Le DEET a été identifié comme pouvant déplacer un radioligand marqué des sites orthostériques de basse affinité des récepteurs muscariniques de types 1 et 3 (M1 et M3)[99]. Cet effet a été constaté pour des concentrations en DEET de l'ordre de 10^{-3} M et laisse suggérer un effet antagoniste du DEET pour ces récepteurs[99]. Cependant, dans cette même étude, les expériences de docking du DEET pour les récepteurs M1 et M3 suggèrent des interactions moléculaires entre le DEET et un site allostérique de haute affinité[99]. Ces résultats mettent en évidence une particularité du DEET à agir à la fois comme modulateur allostérique de M1 et M3 à faible concentration et comme antagoniste de ces récepteurs à forte concentration.

De plus, cette même équipe avait déjà, quelques années auparavant, identifié l'AchE, comme une autre cible du DEET. En effet, le DEET est capable d'inhiber de manière concentration croissante l'activité de l'AchE humaine[98].

Le DEET, en agissant à la fois sur les récepteurs muscariniques et sur l'AchE, interfère donc de façon étroite avec le système cholinergique.

3 - Hypothèse de l'effet pro-angiogénique du DEET

Comme évoqué plus haut, le DEET est connu pour être un inhibiteur de l'AchE humaine. Les inhibiteurs de l'AchE sont également une classe de médicaments utilisés pour le traitement de la maladie d'Alzheimer qui comprend le donépézil, la rivastigmine et la galantamine. Or, ces trois médicaments ont un effet pro-angiogénique *in vitro* et/ou *in vivo*[141,142]. De plus, il a été montré lors de ces études que l'Ach possédait un effet pro-angiogénique qui était associé à une augmentation de l'expression du VEGF par les cellules endothéliales et qui était sensible à l'atropine, un antagoniste non sélectif des récepteurs muscariniques[141]. La diminution de la dégradation de l'Ach par inhibition de l'AchE entraine donc un effet pro-angiogénique en ciblant directement les récepteurs muscariniques des cellules endothéliales. Plus particulièrement, parmi les voies muscariniques impliquées dans les

CC BY NC ND

processus tumoraux, l'activation de la voie M3 apparait prépondérante par rapport aux autres voies principales, notamment M1 et M2[33].

Pour ces études, la question de la provenance de l'Ach se pose. Si l'expression de l'AchE ainsi que des récepteurs cholinergiques – muscariniques et nicotiniques - par les cellules endothéliales est clairement démontrée[143], la sécrétion de l'Ach par ces mêmes cellules le reste beaucoup moins. Du fait de sa très faible concentration dans le milieu de culture de cellules endothéliales, les techniques de dosage de l'Ach demeurent très complexes à mettre en oeuvre[141]. Cependant, la présence du système cholinergique non neuronal (SCNN) a été démontrée dans de nombreux autres types cellulaires qu'ils soient primaires avec les kératinocytes et les cardiomyocytes, comme de lignées tumorales avec les HEK 293 et les H9c2[144,145]. Ces cellules sont en effet capables de sécréter de l'Ach grâce aux enzymes classiquement retrouvées dans les neurones sécréteurs d'Ach comme la choline acétyltransférase (ChAT) ainsi que les transporteurs vésiculaires intracellulaires de l'Ach (VAChT)[145,146].

La présence de ce système enzymatique a été mise en évidence dans un modèle de cellules endothéliales humaines primaires (HUVECs) ainsi que sur des vaisseaux de tissus cutanés humains[147]. La sécrétion d'Ach par ces cellules endothéliales est également très fortement suspectée[147]. Même si ces résultats doivent être confirmés afin de conclure définitivement quant à la présence du SCNN au niveau endothélial, de nombreuses données de la littérature tendent vers la validation de cette hypothèse.

De plus, le SCNN est connu pour participer au développement tumoral, en agissant, d'une part, directement sur les cellules tumorales, et d'autre part, en intervenant dans les processus angiogéniques[148,149]. Si l'activation des voies nicotiniques par le SCNN est désormais clairement identifiée comme favorisant le développement tumoral, la participation de la voie muscarinique semble dépendre de la nature des cellules tumorales, cette dernière ayant été documentée pour les cancers du côlon, du sein, de la prostate et le glioblastome[148,150,151].

Au regard de ces données de la littérature, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle le DEET, en inhibant l'AchE, aurait un effet pro-angiogénique impliquant la voie du récepteur M3 au niveau endothélial. Cette hypothèse fait l'objet de notre première étude.

CC BY NC ND

CC BY NC ND

CC BY NC ND

TROISIEME PARTIE : ROLE DE PTP1B ET DU STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE INDUITE PAR LE DIABETE DE TYPE 1

Dans un second temps, les mécanismes endothéliaux ont été étudiés avec un angle de vue orienté cette fois-ci non pas vers l'angiogenèse mais vers la dysfonction endothéliale induite par le diabète.

Le diabète est une pathologie se traduisant par une glycémie à jeun supérieure à 1,26 g/L à deux reprises ou 2,0 g/L à n'importe quel moment de la journée. Cette hyperglycémie résulte de perturbations métaboliques entrainant des troubles de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage du glucose. Ces perturbations métaboliques impliquent une altération de la sécrétion et/ou la sensibilité à l'insuline, une hormone sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas permettant aux organes d'utiliser le glucose.

Dans cette partie, la physiopathologie du diabète de type 1 (DT1) sera présentée brièvement, suivi des complications vasculaires qu'il entraine. Puis, le rôle d'une protéine, PTP1B, et d'un processus cellulaire, le stress du réticulum endoplasmique (RE) seront évoqués dans la dysfonction endothéliale induite par le diabète.

1 - Diabète type 1

Il existe deux types de diabète : le DT1 également appelé insulino-dépendant, et le diabète de type 2 (DT2), non insulino-dépendant. Le DT1 est une maladie auto-immune où les anticorps du sujet se dirigent contre ses propres cellules β du pancréas. Ce diabète est détecté chez les sujets jeunes et résulte d'un défaut de sécrétion d'insuline. Le DT2 survient généralement chez les sujets plus âgés (autour de 40 ans) et résulte le plus souvent d'une sédentarité, d'un surpoids ou d'une obésité induisant une résistance à l'insuline et une réduction progressive de la sécrétion d'insuline. La partie ci-dessous est focalisée sur le DT1.

a) Epidémiologie et étiologie

Le DT1 comprend environ 5 % des cas totaux de diabète dans le monde et sa prévalence est estimée entre 1 pour 2000 et 1 pour 10 000 selon le sexe, l'âge, la race et la localisation géographique[152,153]. Bien que la proportion du DT1 soit faible par rapport à celle du DT2, son

CC BY NC ND

incidence augmente depuis les années 1990 de 2 à 5 % chaque année[153]. Plusieurs facteurs de risque génétiques ont été identifiés, notamment les allèles DR3 et DR4 du gène codant pour le complexe de présentation des antigènes aux lymphocytes T HLA (*human leukocyte antigen*). En effet, entre 90 et 95 % des jeunes enfants atteints de DT1 portent au moins un de ces deux allèles tandis que moins de 0,1 % portent l'allèle protecteur DR2[154,155]. Cependant, ces facteurs génétiques n'expliquent pas en totalité la constante augmentation de l'incidence du DT1 notamment dans les pays développés[156]. L'étiologie du DT1 fait donc actuellement l'objet de nombreuses études. Récemment, en mettant en évidence une corrélation inversée entre l'incidence des maladies auto-immunes et l'incidence des infections parasitaires dans le monde, Zaccone P. et Hall S. ont suspecté l'hypothèse de l'hygiène comme facteur de risque supplémentaire du DT1[157] (Figure 14). A l'origine formulée pour les allergies[158], l'hypothèse de l'hygiène stipule que la diminution de l'exposition à des maladies infectieuses due à une amélioration de l'hygiène, de leur prévention et de leur prise en charge médicale est un facteur contribuant de façon importante à l'augmentation de l'incidence des maladies auto-immunes dans le monde. Aujourd'hui, de nombreuses études et revues de la littérature tendent à confirmer cette hypothèse pour le DT1[157,159–162].

CC BY NC ND

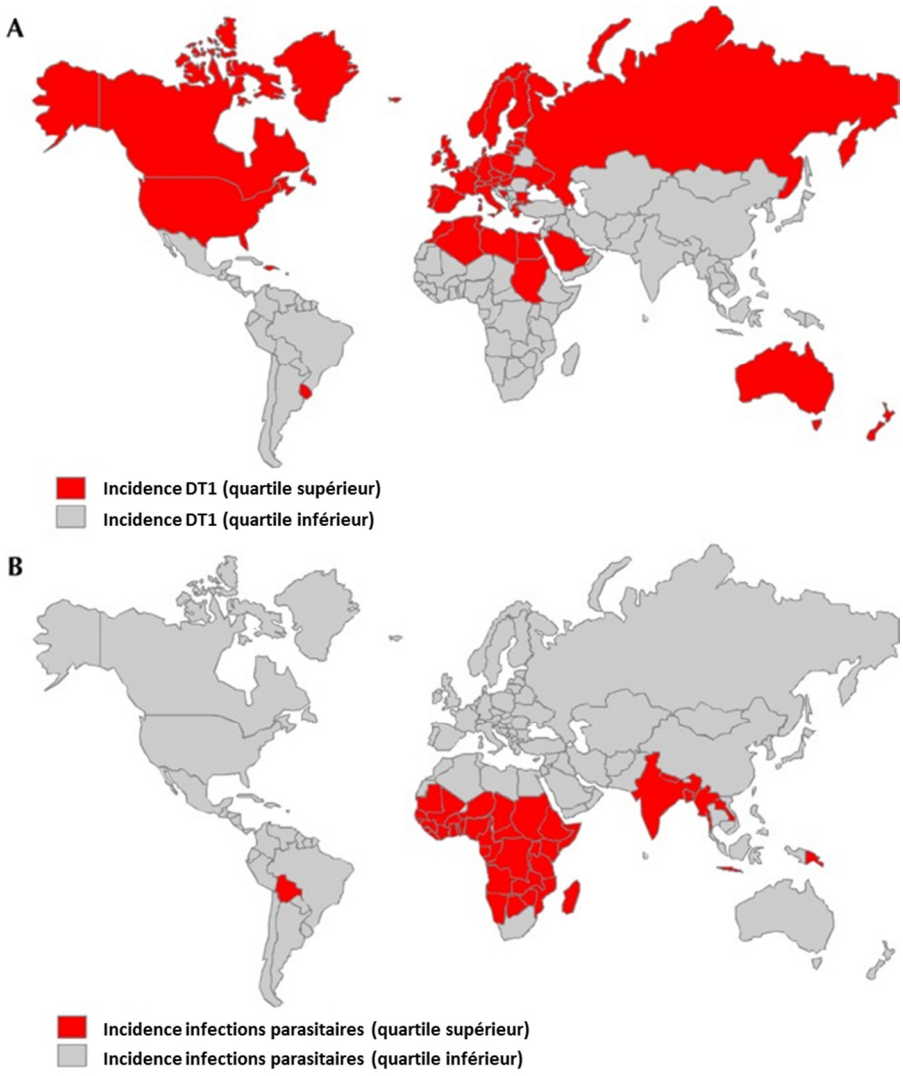


Figure 14 : Corrélation inversée entre l'incidence du DT1 (A) et l'incidence des infections parasitaires (B) dans le monde (adapté à partir de Zaccone P et Hall S. 2012).

Les causes du DT1 ne sont à l'heure actuelle pas totalement élucidées. Cependant, il est clair que le DT1 apparaît aujourd'hui comme une pathologie multi factorielle. Parmi ces facteurs, les mécanismes immunitaires et l'environnement ont été identifiés comme jouant un rôle prépondérant.

b) Traitements

Une fois diagnostiqué, le DT1 est traité par de l'insuline administrée le plus souvent en sous-cutanée dans la paroi abdominale, la cuisse, le haut du bras, la région deltoïde ou la région fessière. De nombreuses insulines sont disponibles sur le marché avec des propriétés pharmacocinétiques différentes permettant une action rapide, lente ou retardée. Le traitement

CC BY NC ND

est instauré au cas par cas avec pour objectif d'atteindre un équilibre de la glycémie de façon permanente. Les patients diabétiques sont également amenés à suivre des cours d'éducation thérapeutique afin de maîtriser la lecture de la glycémie, l'auto injection de l'insuline et les règles hygiéno-diététiques permettant notamment de prévenir les acidocétoses, qui sont la cause la plus fréquente de décès lié au DT1 ainsi que les hypoglycémies, effet secondaire principal de l'insuline pouvant mener à une fatigue, une perte de conscience, un coma voire au décès du patient.

Au long terme, les complications du DT1 sont liées à l'hyperglycémie chronique qui affecte principalement le système vasculaire et plus particulièrement l'endothélium, les cellules endothéliales étant constamment exposées à cette hyperglycémie.

2 - Complications vasculaires du DT1

En plus d'être une pathologie métabolique, le diabète est considéré comme une maladie vasculaire à cause de ses effets sur la macro- et la microcirculation. Le contexte diabétique tel que l'hyperglycémie et l'excès d'acides gras libres peut induire au niveau vasculaire un stress oxydant, une inflammation, une agrégation plaquettaire et une dysfonction endothéliale.

a) Micro- et macroangiopathie

Cette atteinte vasculaire se traduit par des micro- et des macroangiopathies. Les microangiopathies affectent les capillaires tandis que les macroangiopathies affectent les artères de plus gros calibre. En clinique, les microangiopathies peuvent mener à une rétinopathie et entrainer une baisse de la vue pouvant aller jusqu'à la cécité, une néphropathie conduisant à une insuffisance rénale et une neuropathie qui peut être responsable de douleurs, de perte de sensibilité mais également de problèmes digestifs, cardiovasculaires ou urinaires si le système nerveux autonome est touché. Les macroangiopathies quant à elles peuvent entrainer une artériopathie des membres inférieurs se traduisant par une douleur à la marche, une coronaropathie pouvant aller jusqu'à l'infarctus du myocarde et un accident vasculaire cérébral. De façon beaucoup plus sournoise, la conjugaison des atteintes nerveuses et vasculaires peuvent causer des plaies indolores au niveau des pieds passant ainsi inaperçu. En l'absence de traitement, une infection et/ou une nécrose peuvent apparaître ne laissant d'autre choix que l'amputation du membre. Le DT1 est ainsi la première cause d'amputation en France, un

CC BY NC ND

diabétique sur dix se verra, au moins une fois, amputé d'une partie (orteil) voir d'un membre entier[163,164].

b) La dysfonction endothéliale induite par le diabète

Le glucose présent dans le sang est capté par la cellule endothéliale grâce à un transport de diffusion facilitée, son absorption endothéliale est donc insulino-indépendante. Une fois dans la cellule endothéliale, le glucose est métabolisé par la voie classique de la glycolyse pour donner du pyruvate puis de l'acétylCoA qui entrera par la suite dans le cycle de Krebs des mitochondries afin de fournir l'ATP. Cependant, en conditions hyperglycémiques, le glucose peut entrainer l'activation d'autres voies métaboliques[165,166]. Il peut alors être dégradé par la voie du sorbitol qui transforme, *in fine*, le glucose en fructose, et conduit à un déséquilibre de la balance redox par une diminution du ratio $NADPH/NADP^+$ et une augmentation du ratio $NADH/NAD^+$ donc des ROS, ainsi qu'à une augmentation des produits finaux de la glycation avancée (*advanced glycation end products*, AGEs)[166]. L'hyperglycémie au niveau endothélial peut également activer la voie de l'héxosamine par le biais du fructose-6-phosphate et induire une augmentation de la transcription de PAI-1 et de TGF-β, perturbant ainsi la fibrinolyse et la prolifération[167]. Enfin, le glycéraldéhyde-3-phosphate, produit de dégradation de la glycolyse, active la PKC *via* le diacylglycérol (DAG). Une fois activée, la PKC entraine une augmentation de la perméabilité vasculaire, augmente la production de ROS et de l'ET-1 et diminue l'activité de la eNOS entrainant par conséquent une diminution de la production du NO[166,168,169] (Figure 15).

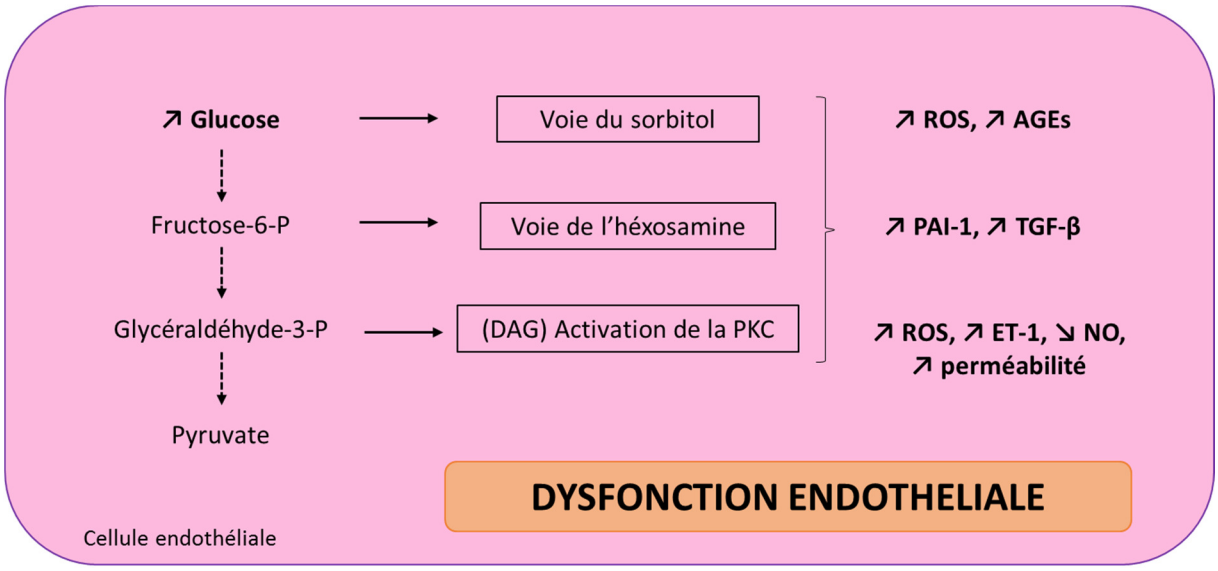


Figure 15 : Voies métaboliques et facteurs identifiés dans la dysfonction endothéliale induite par l'hyperglycémie.

CC BY NC ND

De nombreuses études *in vitro* ont donc permis d'identifier le métabolisme glucidique endothélial comme étant au moins en partie responsable de la dysfonction endothéliale induite par l'excès de glucose, les ROS y jouant notamment un rôle prépondérant[165].

Cependant, la dysfonction endothéliale induite par le diabète est également associée à d'autres perturbations métaboliques comme une augmentation des marqueurs de l'inflammation tels que l'interleukine 1β (Il-1β), l'Il-6, le *tumor necrosis factor* α (TNFα) et la CRP ainsi qu'une augmentation des protéines d'adhésion telles que *vascular cell adhesion protein* 1 (VCAM-1), *intercellular adhesion molecule* 1 (ICAM-1) et la E-sélectine au niveau endothélial[170,171]. Ces marqueurs, associés à la dysfonction endothéliale, contribuent à l'apparition de l'athérosclérose[171].

Plus récemment, d'autres facteurs comme les micro ARN (miR), les *toll like receptors* (TLRs) et la *protein tyrosine phosphatase* 1B (PTP1B) ont été identifiés comme étant associés à la dysfonction endothéliale induite par le diabète[172–176]. Malgré un nombre croissant d'études, leur rôle dans la physiopathologie de la dysfonction endothéliale en conditions diabétiques reste actuellement à déterminer. La partie ci-dessous détaille les rôles de PTP1B au niveau vasculaire ainsi que son lien avec le stress du RE sous l'influence du DT1.

3 - Lien entre PTP1B et stress du RE dans la dysfonction endothéliale

a) PTP1B

PTP1B est une protéine ubiquitaire de la famille des *protein tyrosine phosphatases* (PTPs) actuellement activement étudiée en raison notamment de son implication dans les processus cancéreux ou dans les pathologies métaboliques comme le diabète et l'obésité. En effet, les souris déficientes en PTP1B ont, entre autres, une meilleure sensibilité à l'insuline, une meilleure tolérance au glucose et une résistance à l'obésité sous un régime riche en graisse[177]. Au niveau endothélial, l'insuline, en agissant sur son récepteur (IR), d'un côté augmente la production du NO par la eNOS *via* l'axe *insulin receptor substrate 1/phosphoinositide 3-kinase*/Akt (IRS1/PI3K/Akt), et de l'autre induit la production d'ET-1 à travers la voie des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK)[178]. PTP1B, en inhibant la phosphorylation de IRS1 et en inactivant IR à travers sa déphosphorylation peut conduire à un déséquilibre de la balance NO/ET-1 et ainsi mener à une dysfonction endothéliale[178]. De plus, le NO peut inhiber l'activité de PTP1B constituant une boucle de régulation de la voie de l'insuline[179] (Figure 16).

CC BY NC ND

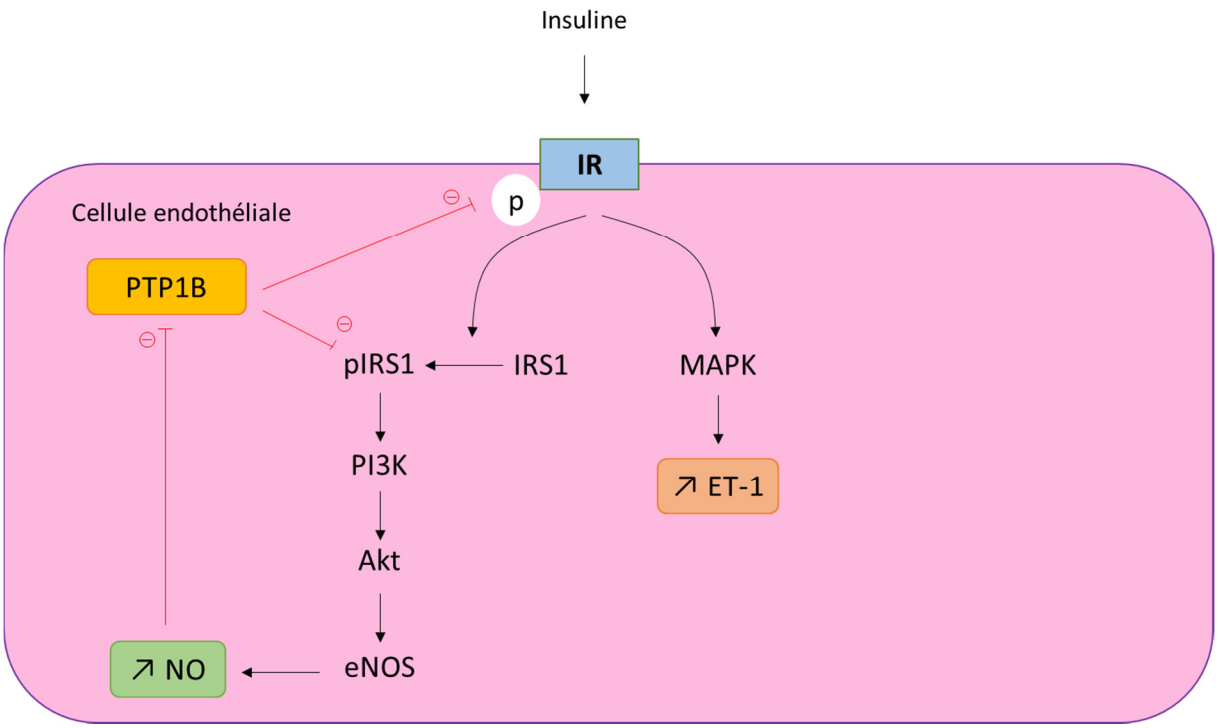


Figure 16 : Régulation endothéliale de la voie de l'insuline par PTP1B.

Concernant les effets vasculaires de PTP1B, il a été montré qu'un traitement par différents inhibiteurs pharmacologiques de cette phosphatase permettait de restaurer *ex vivo* la fonction endothéliale chez un modèle murin atteint d'insuffisance cardiaque chronique[180]. Ces résultats ont été par la suite confirmés *in vivo*. En effet, la délétion totale de PTP1B ou un traitement pendant deux mois par un inhibiteur de PTP1B permettent tous deux de prévenir la dysfonction endothéliale induite par l'insuffisance cardiaque chronique[181]. De façon intéressante, cette amélioration de la fonction endothéliale est constatée sur artères mésentériques suite à une vasorelaxation induite par le flux et non suite à une stimulation par acétylcholine. Cette donnée confirme que la délétion de PTP1B comme son inhibition pharmacologique *in vivo* permettent de restaurer la fonction endothéliale induite par l'insuffisance cardiaque chronique par une voie indépendante du calcium[181].

Plus récemment la question du rôle spécifique de PTP1B au niveau de l'endothélium a été adressée grâce au modèle de souris PTP1B KO spécifiquement endothélial (PTP1B ECKO). Il avait déjà été montré que la délétion spécifiquement endothéliale de PTP1B augmentait l'angiogenèse et l'artériogenèse *in vivo* en régulant la voie endothéliale du VEGFR2 et en activant la voie ERK[79]. Cette propriété a ensuite été étudiée au niveau cardiovasculaire. En effet, les souris PTP1B ECKO présentent une amélioration des fonctions cardiaques ainsi

CC BY NC ND

qu'une augmentation de l'expression endothéliale du VEGF, ERK1/2 et de la eNOS lors de l'hypertrophie cardiaque induite par constriction aortique transverse[182]. De plus, la délétion spécifiquement endothéliale de PTP1B permet de restaurer *in vivo* la fonction endothéliale induite par l'insuffisance cardiaque chronique[54], confirmant ainsi l'importance du rôle de PTP1B particulièrement au niveau de l'endothélium et soulignant son intérêt dans les nouvelles stratégies thérapeutiques de la dysfonction endothéliale.

Dans le cadre du diabète, il a été rapporté que la déficience totale en PTP1B chez la souris prévient la dysfonction endothéliale induite par la streptozotocine (STZ), un inducteur du DT1[176]. En revanche, aucune étude n'a montré jusqu'à présent si la protection vasculaire de PTP1B dans un modèle de DT1 relevait spécifiquement de son absence au niveau endothélial.

b) Stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite directement lié à la membrane nucléaire et uniquement présent chez les cellules eucaryotes ayant pour rôle l'assemblage, le repliement et le transport des protéines membranaires et sécrétées par la cellule. Cependant, il peut arriver qu'une protéine soit mal repliée. Dans ce cas, elle est retenue dans le RE et soit prise en charge par les protéines chaperones de façon à rétablir le bon repliement, soit dégradée par le protéasome. Lorsque les cellules sont soumises à certaines conditions, la quantité de protéines anormalement repliées augmente si fortement qu'elles saturent les systèmes de réparation des chaperones et de dégradation du protéasome. L'accumulation des protéines anormales induit une situation de stress cellulaire appelée stress du RE. Ce stress du RE va stimuler la cellule de façon à ce qu'elle active ses autres voies d'élimination des protéines, c'est la réponse UPR (*unfolded protein response*). Trois voies de signalisation seront ainsi activées : *inositol-requiring enzyme 1* (IRE1), *activating transcription factor 6* (ATF6) et *protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK). Plus précisément, les protéines mal repliées vont être prises en charge par *binding immunoglobulin protein* (BiP ou *glucose-regulated protein 78* kDa, GRP78). La dissociation de GRP78 de PERK, IRE1α et ATF6 engendre l'activation de ces voies qui vont entrainer une cascade de signalisation incluant *activating transcription factor 4* (ATF4), *nuclear factor-κB* (NFκB), *Jun amino-terminal kinases* (JNK), les caspases et l'épissage de *X-box binding protein 1* (XBP1) menant *in fine* à l'activation de facteurs de transcriptions impliqués dans l'inflammation et le cycle cellulaire. GRP78 est donc un marqueur important et pertinent du stress du RE. Cependant, si cette réponse UPR est trop intense ou de trop longue durée, elle peut entrainer l'activation de l'apoptose cellulaire[183] (Figure 17).

CC BY NC ND

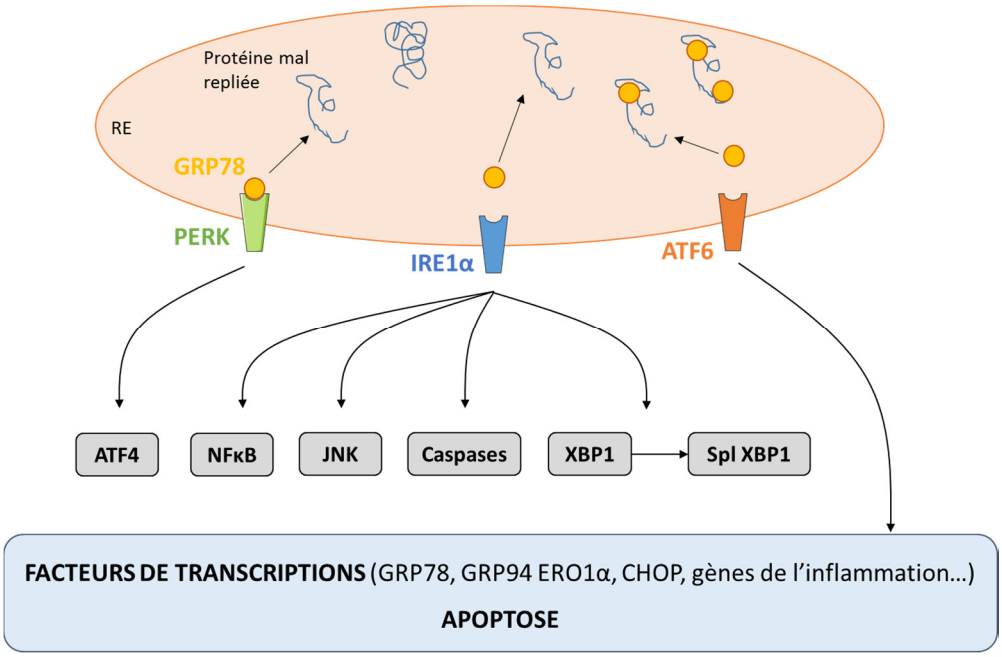


Figure 17 : Principales voies de signalisation déclenchées par le stress du RE

Au niveau des vaisseaux, le stress du RE facilite le découplage de la eNOS et induit une augmentation du stress oxydant menant ainsi à une apoptose endothéliale et à une inflammation vasculaire[184]. En effet, des souris traitées par injection intra-péritonéale de tunicamycine, un inducteur du stress du RE (deux fois par semaine pendant deux semaines) conduit à une dysfonction endothéliale dépendante et indépendante de l'endothélium[185]. En accord avec ces résultats, il a également été rapporté récemment que l'inhibition du stress du RE était associée à une augmentation de la phosphorylation de la eNOS et à une augmentation de la relaxation dépendante de l'endothélium dans un modèle murin d'hypertension artérielle[186].

En conditions diabétiques, un traitement par molécules ayant un rôle de chaperones (acide 4-phénylbutyrique et l'acide ursodéoxycholique conjugué à la taurine) améliore les capacités adaptatives du RE ainsi que l'homéostasie du glucose[187]. De la même façon, l'inhibition pharmacologique du stress du RE par le TUDCA prévient les défauts de néovascularisation *in vivo* chez la souris *db/db*, identifiant ainsi le stress du RE comme cible potentiel dans le traitement du diabète et des pathologies cardiovasculaires[188]. D'ailleurs, il a été montré que l'inhibition pharmacologique du stress du RE permettait de prévenir la dysfonction endothéliale induite par la STZ, soulignant ainsi le rôle primordial du stress du RE dans la fonction endothéliale chez un modèle murin de DT1[189]. Egalement, il a été montré que l'hyperglycémie induisait un stress du RE au niveau endothélial indépendamment de l'augmentation du stress oxydant et de l'effet osmotique[190–192]. Le stress du RE constitue donc

CC BY NC ND

une voie importante permettant potentiellement de prévenir la dysfonction endothéliale induite par le DT1.

Par ailleurs, il faut souligner que PTP1B est directement lié à la membrane du RE et que son activité est impliquée dans les régulations des voies de signalisation du stress du RE. Ainsi, l'absence de PTP1B permet de prévenir le stress du RE et l'apoptose que celui-ci provoque dans les fibroblastes et les cellules hépatiques[193,194]. Cependant, la déficience de PTP1B dans les adipocytes ainsi que sa surexpression dans les cellules β du pancréas permet de prévenir l'augmentation des marqueurs du stress du RE induit par la tunicamycine[195]. Par conséquent, si les liens entre PTP1B et le stress du RE sont certains, leurs effets semblent varier selon le type cellulaire. Malgré ces liens avérés les rôles conjugués de PTP1B et du stress du RE dans les conditions diabétiques demeurent insuffisamment élucidés.

4 - Hypothèse de travail

Le DT1 est un risque de pathologies vasculaires et la dysfonction endothéliale est un marqueur précoce d'apparition de ces pathologies. *In vitro*, une forte concentration de glucose augmente l'expression de PTP1B et induit un stress du RE[176]. *In vivo*, l'hyperglycémie est associée à une augmentation de l'expression de PTP1B au niveau vasculaire[176]. Ainsi, nous avons posé l'hypothèse selon laquelle PTP1B serait directement régulée au niveau endothélial par la glycémie et que le stress du RE pourrait être impliqué dans cette régulation, tous deux étant responsables de la dysfonction endothéliale induite par le diabète. Cette hypothèse fait l'objet de notre deuxième étude (Figure 18).

CC BY NC ND

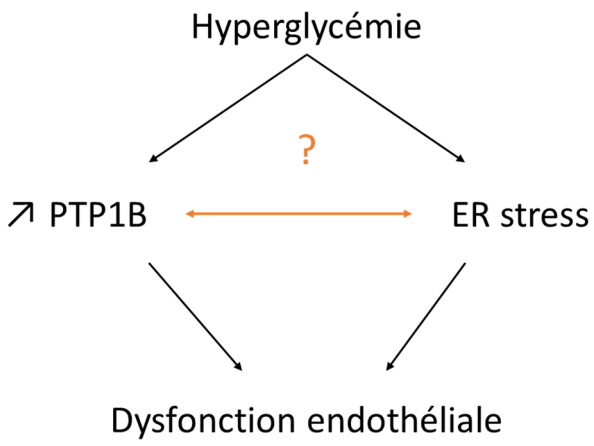


Figure 18 : Hypothèse de l'augmentation de l'expression de PTP1B et du stress du RE par l'hyperglycémie conduisant à la dysfonction endothéliale.

cc BY NC ND

BY NC ND

RESULTATS

Les résultats de ces deux études sont présentés ci-dessous et sont précédés d'une partie matériels et méthodes. Dans un premier temps, les résultats concernant l'évaluation de l'effet du DEET dans les processus d'angiogenèse seront explicités et suivis d'une discussion. Puis les résultats concernant le rôle de PTP1B et du stress du RE dans la dysfonction endothéliale induite par le DT1 seront présentés. Ces derniers sont précédés de résultats préliminaires ainsi que des matériels et méthodes utilisés et seront suivis d'une discussion.

PREMIERE ETUDE : EVALUATION DE L'EFFET DU DEET DANS LES PROCESSUS MENANT A L'ANGIOGENESE

1 - Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude est de vérifier l'hypothèse selon laquelle le DEET, en inhibant l'AChE, aurait un effet pro-angiogénique impliquant la voie du récepteur M3 au niveau endothélial.

2 - Méthodes

Culture cellulaire

Les HUVECs (*Human Umbilical Venous Endothelial Cells*) proviennent de cordons ombilicaux mâles (Lonza®) et ont été mises en culture dans des flasques T75 Corning® dans du milieu EGM-2 (Lonza®) contenant 8 % de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco®). Elles ont été utilisées entre leur 2ème et leur 4ème passage après incubation dans une atmosphère contrôlée à 37 °C avec 5 % de CO_2 et saturée en H_2O. Une fois à 80 % de confluence, des cellules ont été, ou non, transfectées avec un siRNA M3 ou contrôle (Santa Cruz, SC35833) avec de la Lipofetamine (invitrogen, life technologies) dans du milieu Opti-MEM (Lonza) pendant 24 h. Après 3 jours, les cellules ont été traitées ou non pendant 24 h avec du DEET (Sigma-Aldrich, 1197007) utilisé à deux concentrations 10^{-8} M et 10^{-5} M. Des expériences ont également été menées en l'absence ou en présence d'un antagoniste sélectif de M3, le para-fluorohexahydrosiladiphenidol (pFHHSiD, Sigma-Aldrich, H127) (pA2 = 7,9)[196].

CC BY NC ND

Les cellules endothéliales primaires murines ont été isolées à partir des aortes de souris *Swiss*. La méthode d'extraction a été adaptée du protocole de Kobayashi[197]. Les cellules endothéliales murines ont été cultivées dans un milieu de croissance EGM-2 supplémenté avec 5 % de SVF décomplémenté et ont été utilisées jusqu'à leur 4ème passage.

Les cellules embryonnaires de rein humain (*human embryonic kidney 293*, HEK 293) surexprimant stablement le récepteur muscarinique M3 humain couplé à une protéine Gαq/11 (HEK 293/M3) ont été fournies par le Dr Gary B. Willars (Leicester, Grande Bretagne)[198]. Ces cellules ont été mises en culture dans le milieu de Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Lonza, BE12-604F), complété par 500 µg.mL-1 de généticine (G-418) (Sigma-Aldrich, A1720), 1 % de pénicilline/streptomycine et 10 % de SVF décomplémenté.

Les cellules U87MG de glioblastome-astrocytome et les cellules B16F10 de mélanome ont été fournies par le laboratoire INSERM U1066 MINT (Angers - France). Ces cellules ont été cultivées dans du DMEM, supplémenté avec 1 % de L-glutamine, 1 % de pénicilline/streptomycine et 10 % de SVF décomplémenté.

Modèles animaux

Toutes les procédures impliquant les animaux, y compris les protocoles de reproduction, ont été menées conformément aux protocoles approuvés par le comité régional d'éthique et autorisées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Autorisation no. C49063, 11/22/2011). De plus, les expériences réalisées sur animal ont été effectuées en stricte conformité avec les recommandations de la directive européenne pour la protection des animaux à des fins scientifiques (Directive 2010/63/EU).

Tests de prolifération

Les effets des deux concentrations de DEET sur la prolifération des HUVECs, des U87MG et des BF16F10 ont été analysés à l'aide du kit cellulaire CyQUANT® (Molecular Probes, C7026). Les cellules (5.10^3) ont été ensemencées dans des puits d'une plaque 96 puits puis traitées avec du DEET pendant 24 h. Les niveaux de fluorescence ont été détectés sur un lecteur de plaques LB940 Mithra (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne) avec des filtres d'excitation et d'émission de 485 nm et 530 nm respectivement.

CC BY NC ND

Test de viabilité cellulaire

Des HUVECs (10^4) ont été ensemencées dans des puits d'une plaque 96 puits puis traitées avec DEET pendant 24 h. La viabilité a été évaluée par analyse colorimétrique au MTT (Sigma - Aldrich M5655) après obtention des valeurs d'absorbance à la longueur d'onde de 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Mithra LB940).

Mesure d'apoptose par cytométrie en flux

Les HUVECs ont été exposées au DEET (10^{-8} M ou 10^{-5} M) ou à un contrôle positif d'apoptose, l actinomycine D (10^{-6} M) (Sigma- Aldrich, A9415), pendant 24 h puis fixées dans de l'éthanol à 70 % à 4 °C pendant au moins 4 h. Après une centrifugation à 1500 g pendant 5 min, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS contenant 0,05 $mg.mL^{-1}$ de RNase (Sigma-Aldrich, R6513) et 10 $\mu g.mL^{-1}$ d'iodure de propidium (Sigma- Aldrich, P4170). La teneur en ADN cellulaire a été analysée à l'aide d'un cytomètre de flux Cytomics FC500 MPL (Beckman Coulter, Villepinte, France). Pour chaque analyse, 10 000 événements ont été recueillis.

Matrigel® in vitro

Les HUVECs (10^4) ont été ensemencées dans des puits de lames 15 puits d'angiogenèse (Ibidi®) dans lesquelles 10 µL de Matrigel® (Sigma -Aldrich, E1270) avaient été préalablement déposés. Le traitement des cellules avec du DEET pendant 24 h a été effectué directement après la mise en culture sur Matrigel®. Les capillaires formés ont été photographiés sous microscopie à contraste de phase (MOTIC AE21) après 24 h et leur longueur moyenne a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

Matrigel® Plug in vivo

Les cellules endothéliales ont été isolées à partir de souris *Swiss* mâles et cultivées dans un flacon de 25 cm^2 puis traitées ou non avec du DEET (10^{-8} M et 10^{-5} M) pendant 24 h en présence ou en absence de pFHHSiD (10^{-7} M). Après traitement les cellules ont été mélangées avec 500 µL de Matrigel® contenant du bFGF (300 $ng.mL^{-1}$, Peprotech, 100-18B) puis injectées par voie sous-cutanée au niveau du dos de souris *Swiss* mâles âgées de six semaines. Après 14 jours, le Matrigel® des souris a été prélevé, homogénéisé dans un tampon de lyse puis incubé pendant 24 h à 4 °C. La concentration en hémoglobine a été mesurée dans le surnageant après réaction avec le réactif de Drabkin (Sigma- Aldrich, D5941).

CC BY NC ND

Xénogreffe de cellules de glioblastome U87MG sur souris Nude

Une suspension 10^6 cellules de glioblastome U87MG dans 100 µL de DMEM a été injectée en sous-cutanée dans le flanc droit de souris *Swiss Nude* âgées de six semaines (SAS Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Une fois le volume de 100 mm^3 atteint, les souris ont été traitées quotidiennement par voie intrapéritonéale avec le solvant ou du DEET 10^{-5} M ou du pFHHSiD 10^{-7} M ou un mélange de DEET 10^{-5} M plus pFHHSiD 10^{-7} M pendant 28 jours. À la fin du traitement, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs ont été prélevées, mesurées et congelées dans l'azote liquide puis conservées à -80 °C.

Analyse de la microdensité vasculaire

Les tumeurs ont été incluses dans de la paraffine et des sections de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome et déposées sur des lames polylysinées. Les coupes de tumeurs ont été déparaffinées et la production de peroxydes endogènes a été inhibée avec 1 % de peroxyde d'hydrogène (Sigma Aldrich, 216763) pendant 15 min. Les liaisons protéine-protéine ont été lysées par 0,05 % de pepsine dans du HCl 0,01 N pendant 30 min à 37 °C. Les sections ont ensuite été saturées avec 2 % de BSA pendant 30 min à température ambiante puis incubées pendant une nuit à 4 °C avec un anticorps murin anti-CD31 (1:500 dans BSA 2%, BD Bioscience, 557355). Le lendemain, les lames ont été incubées pendant 30 min avec un anticorps biotinylée (1:100 dans du BSA 2%, Vector Laboratories, vectastain), à température ambiante pendant 30 min. Le marquage a été amplifié avec un complexe avidine-biotine (Vector Laboratories, vectastaïne) et détecté avec du diaminobenzidine (DAB), (Sigma-Aldrich, D12384) après une incubation de 10 min. Enfin, les sections ont été contre-marquées avec de l'hématoxyline pendant 20 sec. Chaque section de la tumeur a été photographiée 4 fois par deux manipulateurs indépendants à l'aide d'un microscope à lumière blanche (objectif X20) et la quantification a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

Test de l'activité de l'AchE

L'activité de l'AchE a été analysée en utilisant la méthode d'Ellman[199] . Les HUVECs ont été mise en culture en plaque 96 puits et traitées pendant 24 h en présence de DEET (10^{-5} M ou 10^{-8} M). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 60 min avec 100 µL d'iodure d'acétylthiocholine (ATC, 2 mM, Sigma- Aldrich, A5751) et 100 µL de dithio-dinitrobenzoate (DTNB 1 mM, Sigma- Aldrich, D8130) dans un tampon phosphate à pH = 8,1. L'activité AchE a été mesurée à 37 °C par absorbance à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Mithras

CC BY NC ND

LB940). Le BW284c51 à 10^{-5} M (Sigma- Aldrich) a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de l'activité basale sans inhibiteur.

Test de migration

Des HUVECs (5.10^3) par puits ont été ensemencées en plaque à 96 puits et traitées pendant 24 h avec du DEET. Après traitement, la plaque a été agitée pendant 15 sec. Le surnageant contenant les cellules non-adhérentes a été éliminé par trois lavages avec 0,1 % de BSA dans du milieu sans sérum. Les cellules adhérentes ont été fixées avec 4 % de paraformaldehyde (PFA) pendant 15 min à température ambiante puis rincées deux fois avec du tampon de lavage et colorées avec du cristal violet (1 $mg.mL^{-1}$ dans l'éthanol 2 %) pendant 10 min à température ambiante. Après un lavage abondant à l'eau distillée, 150 µL de SDS 2 % ont été ajoutés et la plaque a été incubée pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée avec un lecteur de microplaques Mithra LB940 à 550 nm (Berthold Technologies).

Test d'adhésion

Les HUVECs ont été mises en suspension dans de l'EGM-2 avec 10 % de FBS puis 5.10^4 cellules ont été ensemencées dans la chambre supérieure de l'insert Transwell® (membrane en PTFE avec un diamètre de pores de 8 µm, Corning). La chambre inférieure a été remplie avec 1 mL d'EBM-2 contenant 20 % de FBS, avec ou sans DEET. Après 24 h, les cellules ayant migré ont été fixées avec 4 % de PFA pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont été rincées deux fois avec un tampon de lavage puis colorées avec du cristal violet (1 $mg.mL^{-1}$ dans l'éthanol 2 %, Sigma-Aldrich, C6158) pendant 10 min à température ambiante et lavées abondamment avec de l'eau distillée. Après un lavage abondant à l'eau distillée, du SDS 2 % a été ajouté et la plaque a été incubée pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée avec un lecteur de microplaques Mithra LB940 à 550 nm (Berthold Technologies).

Western Blot

Après traitement, les cellules ont été lysées et homogénéisées dans du tampon RIPA. Les protéines (30 pg) ont été séparées sur gel de polyacrylamide-SDS par électrophorèse puis transférées sur membrane de cellulose. Les membranes ont été incubées avec des anticorps anti peNOS -Ser , peNOS -Thr (Cell Signaling, # 9571, # 9574) , eNOS (BD Biosciences, 610297), p-FAK (Cell Signaling Technology, # 3284), VEGF (Santa Cruz Biotechnology, SC152) . Un anticorps monoclonal anti-β-actine (Sigma- Aldrich, A5316) a été utilisé pour détecter la

CC BY NC ND

protéine de référence. Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire conjugué à la *horse radish peroxidase* (HRP) (Santa Cruz Biotechnology, SC2313 et LC 2005). Les complexes protéine-anticorps ont été détectés avec du luminol (Thermo Scientific, # 34096).

Microscopie confocale

Une fois traitée pendant 24 h avec 10^{-8} M ou 10^{-5} M DEET, les HUVECs ont été fixés avec 4 % paraformaldéhyde pendant 15 min à température ambiante puis perméabilisées avec 0,1 % de Triton X-100 dans du PBS. Les cellules ont ensuite été saturées avec 5 % de BSA dans du PBS pendant 1 h à température ambiante puis incubées avec un anticorps polyclonal de lapin anti-p-FAK (Cell Signaling Technology, # 3284) pendant une nuit à 4 °C. Après lavage avec du PBS, les cellules ont été incubées avec un anticorps de chèvre anti-lapin Alexa 488 (Molecular probe, 31210) pendant 1 h à température ambiante. Dans une autre série d'expériences, la tétraméthylrhodamine isothiocyanate-phalloïdine (phalloïdine, Sigma-Aldrich, P1951) a été utilisée pour marquer des fibres d'actine. Après traitement, les cellules ont été fixées avec 4 % de PFA, puis colorées à la phalloïdine (50 $\mu g.mL^{-1}$) pendant 30 min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées puis visualisées avec un microscope confocal (CLMS 700, Zeiss, le logiciel ZEN).

Mesure du NO et de l'$O_2^{\bullet -}$ par résonance paramagnétique électronique (RPE)

La production de NO a été réalisée en utilisant le Fe^{2+}-diéthyldithiocarbamate (DETC , Sigma-Aldrich, D95503) comme capteur de spin. Les cellules ont été traitées avec du DEET pendant 24 h puis le milieu a été remplacé par 250 µL de solution de Krebs. Les HUVECs ont ensuite été traitées avec 250 µL du complexe $Fe[DETC]_2$. Après incubation de 45 min à 37 °C, les cellules ont été congelées dans des tubes en plastique et la production endothéliale du NO a été mesurée par RPE. Les valeurs sont exprimées en amplitude du signal en fonction de la concentration en protéines (unit.μg^{-1}.µL de protéines).

Pour la quantification du $O_2^{\bullet -}$, les cellules ont été mises dans une solution de Krebs-Hepes de déféroxamine chélaté contenant du 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH ;Noxygen NOX-02) (500 µM), de la déféroxamine (25 µM) et du DETC (5 µM) à température constante (37 °C) pendant 20 min. Les cellules ont ensuite été congelées dans des tubes en plastique et la production de $O_2^{\bullet -}$ a été mesurée par RPE. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de contrôle.

CC BY NC ND

Mesure du signal calcique intracellulaire

Les HUVECs ont été ensemencées dans des puits de lames 8 puits (Ibidi, Martinsried) et les HEK 293/M3 ont été ensemencées sur ces mêmes lames préalablement polylysinées (Ibidi, Martinsried). Après 24 h, les cellules ont été lavées avec une solution de Krebs (NaCl 119 mM, KCl 4,75 mM, $MgSO_4$ 1,17 mM, $CaCl_2$ 2,5 mM, KH_2PO_4 1,18 mM, $NaHCO_3$ 25 mM , glucose 11,1 mM, Hepes 20 mM, pH = 7,40) et chargées avec la sonde moléculaire Fluo- 4 (3 µM, Molecular probe, F14204) pendant 30 min à 37 °C. Les cellules ont ensuite été lavées avec une solution de Krebs et visualisées en microscopie confocale (CLMS 700 Zeiss, 488 nm/510 nm, logiciel ZEN). Après stabilisation de la fluorescence basale, les cellules ont été stimulées avec du carbachol ou de l'ACh (10^{-10} M à 10^{-5} M) en présence ou en l'absence de DEET 1 min avant stimulation. Les images ont été acquises chaque seconde pendant 10 minutes (time laps) avec un objectif X20. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM du rapport de la fluorescence maximale divisée par la fluorescence basale.

Etude de docking du DEET sur M3

Le docking a été réalisé en collaboration avec la société GreenPharma (Orléans, France). La séquence primaire du récepteur M3 a été récupérée à partir du site Uniprot (www.uniprot.com). Les structures cristallines des récepteurs muscariniques ont été extraites à partir de la banque de données de protéines www.rcsb.org. L'alignement des séquences a été réalisé avec ClustalW29 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/) (Figure 19). Le logiciel Surflex-Dock[200] implémenté dans Sybyl-X 2.1 (Tripos, MO, USA) a été utilisé pour la simulation de docking avec le mode GeomX (options par défaut afin d'avoir une précision maximale). Avant le docking, la zone d'interactions a été définie par un Protomol généré selon le site allostérique défini par l'alignement de la structure 3D de M3 (PDB id: 4DAJ)[201] avec M2 (PDB id: 4MQT)[202]. Pour générer le Protomol, les options suivantes ont été utilisées: proto_thresh = 0,5 et proto_bloat = 0. Les paramètres utilisés pour le calcul de docking étaient ceux par défaut: aucune flexibilité sur la protéine, conformations moléculaires supplémentaires MultiStart = 6, taille de la grille grid_bloat = 6 Å, conformations maximales par fragment maxconfs = 20, nombre maximal de rotations par liaison maxrot = 100, permettre une flexibilité dans la molécule (+ ring), le léger traitement de la grille (+ Soft_box), minimisation pré- et post-docking (+ premin & + remin), fragments moléculaires (+ frag), méthode d'alignement de spin activé (+ de spinalign), densité spindens = 9, le nombre de spin par alignement nspin = 12. Les positions avec une distance moyenne au-dessus de div_rms = 0,5 Å ont été conservées et un total de ndoc_final = 20 poses

CC BY NC ND

ont été sélectionnées. Pour chaque position, une affinité a été calculée et exprimée en log10 (Kd).

cc BY NC ND

```
ACM3_HUMAN    MTLHNNSTTSPLFPNISSSWIHSPSDAGLPPGTVTHFGSYNVSRAAGNFSSPDGTTDDPL
ACM3_RAT      MTLHSNSTTSPLFPNISSSWVHSPSEAGLPLGTVTQLGSYNISQETGNFSSND-TSSDPL
              ****.***************:****:**** ****::****:*: :***** * *:.***
Prim.cons.    MTLH2NSTTSPLFPNISSSW2HSPS2AGLP2GTVT22GSYN2S222GNFSS2DGT22DPL

                       70        80        90       100       110       120
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    GGHTVWQVVFIAFLTGILALVTIIGNILVIVSFKVNKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVI
ACM3_RAT      GGHTIWQVVFIAFLTGFLALVTIIGNILVIVAFKVNKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVI
              ****:***********:**************:***************************
Prim.cons.    GGHT2WQVVFIAFLTG2LALVTIIGNILVIV2FKVNKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVI

                      130       140       150       160       170       180
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    SMNLFTTYIIMNRWALGNLACDLWLAIDYVASNASVMNLLVISFDRYFSITRPLTYRAKR
ACM3_RAT      SMNLFTTYIIMNRWALGNLACDLWLSIDYVASNASVMNLLVISFDRYFSITRPLTYRAKR
              **************************:***************************************
Prim.cons.    SMNLFTTYIIMNRWALGNLACDLWL2IDYVASNASVMNLLVISFDRYFSITRPLTYRAKR

                      190       200       210       220       230       240
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    TTKRAGVMIGLAWVISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAIAAF
ACM3_RAT      TTKRAGVMIGLAWVISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAIAAF
              ************************************************************
Prim.cons.    TTKRAGVMIGLAWVISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAIAAF

                      250       260       270       280       290       300
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    YMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAETENFVHPTGSSRSCSSYELQQQSM
ACM3_RAT      YMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAEAENFVHPTGSSRSCSSYELQQQGV
              ************************************:*********************.:
Prim.cons.    YMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAE2ENFVHPTGSSRSCSSYELQQQ22

                      310       320       330       340       350       360
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    KRSNRRKYGRCHFWFTTKSWKPSSEQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSE
ACM3_RAT      KRSSRRKYGRCHFWFTTKSWKPSAEQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSE
              ***.*******************:**********************************
Prim.cons.    KRS2RRKYGRCHFWFTTKSWKPS2EQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSE

                      370       380       390       400       410       420
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    TRAIYSIVLKLPGHSTILNSTKLPSSDNLQVPEEELGMVDLERKADKLQAQKSVDDGGSF
ACM3_RAT      TRAIYSIVLKLPGHSSILNSTKLPSSDNLQVSNEDLGTVDVERNAHKLQAQKSMGDGDNC
              ***************:***************.:*:** **:**:*.*******:.**..
Prim.cons.    TRAIYSIVLKLPGHS2ILNSTKLPSSDNLQV22E2LG2VD2ER2A2KLQAQKS22DG222

                      430       440       450       460       470       480
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    PKSFSKLPIQLESAVDTAKTSDVNSSVGKSTATLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKR
ACM3_RAT      QKDFTKLPIQLESAVDTGKTSDTNSSADKTTATLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKR
               *.*:************.****.***..*:*****************************
Prim.cons.    2K2F2KLPIQLESAVDT2KTSD2NSS22K2TATLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKR

                      490       500       510       520       530       540
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    MSLVKEKKAAQTLSAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFCDSCIPKTFWNLGYWLCYINSTVN
ACM3_RAT      MSLIKEKKAAQTLSAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFCDSCIPKTYWNLGYWLCYINSTVN
              ***:****************************************:***************
Prim.cons.    MSL2KEKKAAQTLSAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFCDSCIPKT2WNLGYWLCYINSTVN

                      550       560       570       580       590
                        |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    PVCYALCNKTFRTTFKMLLLCQCDKKRRKQQYQQRQSVIFHKRAPEQAL
ACM3_RAT      PVCYALCNKTFRTTFKTLLLCQCDKRKRRKQQYQQRQSVIFHKRVPEQAL
              **************** ********:******************.*****
Prim.cons.    PVCYALCNKTFRTTFK2LLLCQCDK2KRRKQQYQQRQSVIFHKR2PEQAL
```

Alignment data :
Alignment length : 590
Identity (*) : 541 is 91.69 %
Strongly similar (:) : 26 is 4.41 %
Weakly similar (.) : 15 is 2.54 %
Different : 8 is 1.36 %
Sequence 0001 : ACM3_HUMAN (590 residues).
Sequence 0002 : ACM3_RAT (589 residues).

Figure 19 : Comparaison des séquences codant pour les récepteurs M3 humain et de rat.

BY NC ND

Binding du DEET sur M3

Le binding a été réalisé par l'entreprise privée CEREP (Celle L'Evescault, France). Brièvement, le récepteur M3 humain purifié (0,2 nM lignées cellulaires CHO) a été mélangé avec 0,2 nM de [^{3}H]-4-DAMP, un antagoniste sélectif du récepteur M3, puis le complexe a été mis à incuber pendant 60 min à température ambiante en l'absence ou en présence de DEET (10^{-11} M à 10^{-4} M). La liaison non spécifique a été déterminée en présence d'atropine (10 µM). La détection a été réalisée par comptage des scintillations. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la liaison spécifique [^{3}H]-4-DAMP. Le 4-DAMP a été utilisé comme composé de référence standard et testé pour chaque expérience à plusieurs concentrations afin d'obtenir une courbe de compétition permettant de calculer l'IC_{50}.

Statistiques

Les données sont présentées en moyenne ± SEM, n représente le nombre d'expériences. Pour la mesure du signal calcique, l'analyse statistique a été effectuée par un test ANOVA. Pour les autres expériences, un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'une correction de Bonferroni a été effectué. Un $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

CC BY NC ND

3 - Résultats

a) Le DEET a un effet pro-angiogénique en agissant spécifiquement sur les cellules endothéliales

La croissance tumorale est un processus impliquant plusieurs types cellulaires dont les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales. Les cellules cancéreuses apparaissent en premier afin de former une tumeur tandis que les cellules endothéliales sont impliquées dans l'angiogenèse, un processus essentiel pour la croissance de la tumeur et son entrée en phase métastasique.

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer quelles étaient les cellules cibles du DEET. Ainsi, des cellules tumorales de glioblastome (U87MG), de mélanome (B16F10) et des cellules endothéliales (HUVECs) ont été traitées pendant 24 h avec du DEET. Comme indiqué dans le tableau 2, le DEET aux deux concentrations (10^{-8} M et 10^{-5} M) n'augmente pas la prolifération des deux modèles cellulaires tumoraux alors qu'il augmente la prolifération endothéliale. Afin de s'assurer de l'absence d'effets apoptotique et cytotoxique du DEET, la viabilité et l'apoptose endothéliale ont été mesurés. Aucun de ces deux effets n'a été observé chez les HUVECs traitées avec du DEET aux deux concentrations tandis que l'actinomycine D (10^{-6} M) augmente l'apoptose des HUVECs (Figure 20). Ces résultats suggèrent que le DEET favorise la prolifération des cellules endothéliales mais pas des cellules tumorales.

Tableau 2 : Les cellules endothéliales sont les principales cibles du DEET.

Prolifération (% ctrl, m ± SEM)	DEET 10^{-8} M	DEET 10^{-5} M	pFHHSiD 10^{-7} M DEET 10^{-8} M	pFHHSiD 10^{-7} M DEET 10^{-5} M
U87MG	98,21 ± 1,59	97,18 ± 1,28	/	/
B16F12	92,86 ± 5,23	93,94 ± 5,62	/	/
HUVEC	113,55 ± 3,16*	112,03 ± 2.90*	102,79 ± 5,41	100,82 ± 5,23

n = 4, *p < 0,05

CC BY NC ND

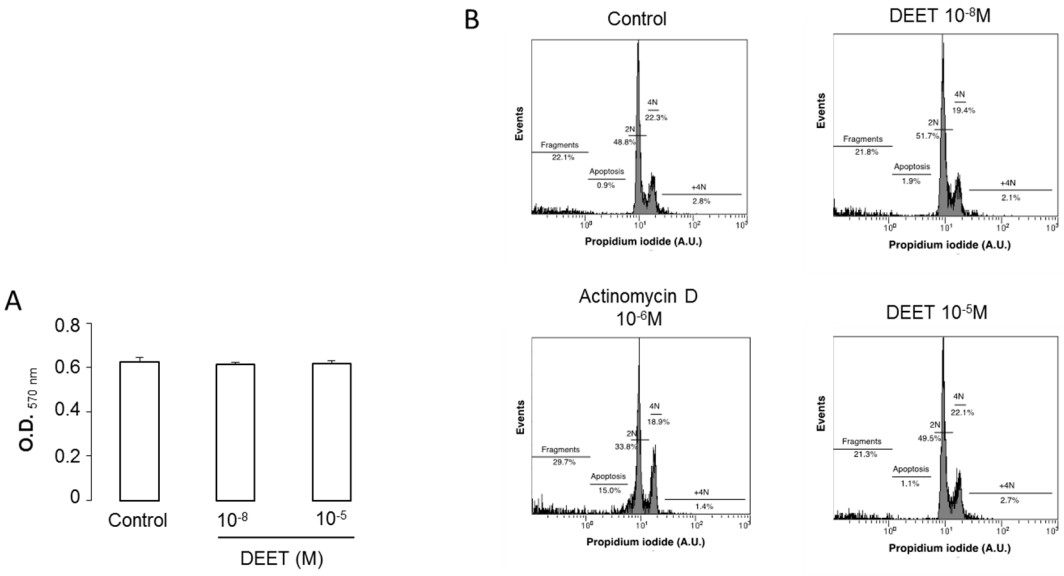


Figure 20 : Le DEET n'a pas d'effet cytotoxique (A) ni pro-apoptotique (B) sur les HUVECs. n = 4.

L'effet du DEET sur l'angiogenèse a ensuite été évalué sur HUVECs en culture sur Matrigel®. Les deux concentrations de DEET augmentent la longueur des capillaires formés par les HUVECs par rapport aux capillaires des HUVECs non traitées (Figure 21 A et B, colonnes blanches). Le DEET, à 10^{-8} M et 10^{-5} M a donc un effet pro-angiogénique *in vitro*.

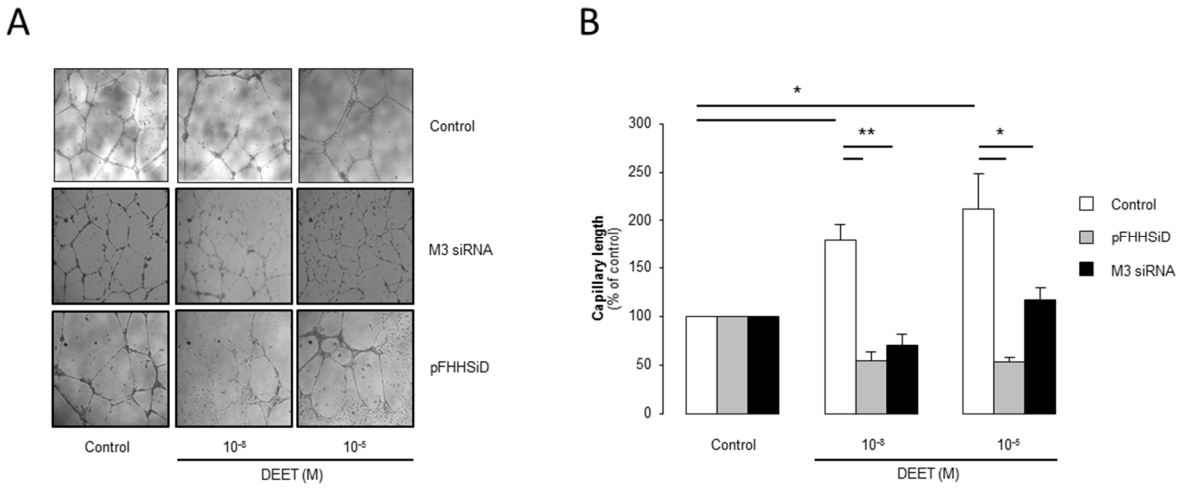


Figure 21 : Le DEET a un effet pro-angiogénique *in vitro* sensible à un antagoniste sélectif de M3 (pFHHSiD) et au siRNA M3. n = 6, *p < 0,05 ; **p < 0,01.

CC BY NC ND

Afin de confirmer ces études *in vivo*, des cellules endothéliales préalablement traitées avec du DEET ont été injectées en sous-cutanée à des souris. La néovascularisation a été appréciée par le dosage de l'hémoglobine 14 jours après l'injection. Les résultats sont présentés en figure 22 (A, colonnes blanches) et confirment l'effet pro-angiogénique du DEET *in vivo*. De plus, la néovascularisation induite par le DEET a été évaluée chez des souris *Nude* xénogreffées avec des cellules U87MG et traitées en intra-péritonéal chaque jour pendant 28 jours avec du DEET de façon à obtenir une concentration plasmatique de 10^{-5} M. Après 28 jours de traitement, la taille des tumeurs des souris traitées avec du DEET était significativement augmentée par rapport à la taille des tumeurs des souris contrôle (Figure 22, B). Le marquage CD31 de coupes de ces tumeurs révèle également une augmentation du nombre et de la taille des capillaires dans les tumeurs de souris traitées par rapport aux tumeurs de souris non traitées (Figure 22 C, D, E). Le DEET a donc un effet pro-angiogénique *in vivo* et augmente la croissance tumorale.

CC BY NC ND

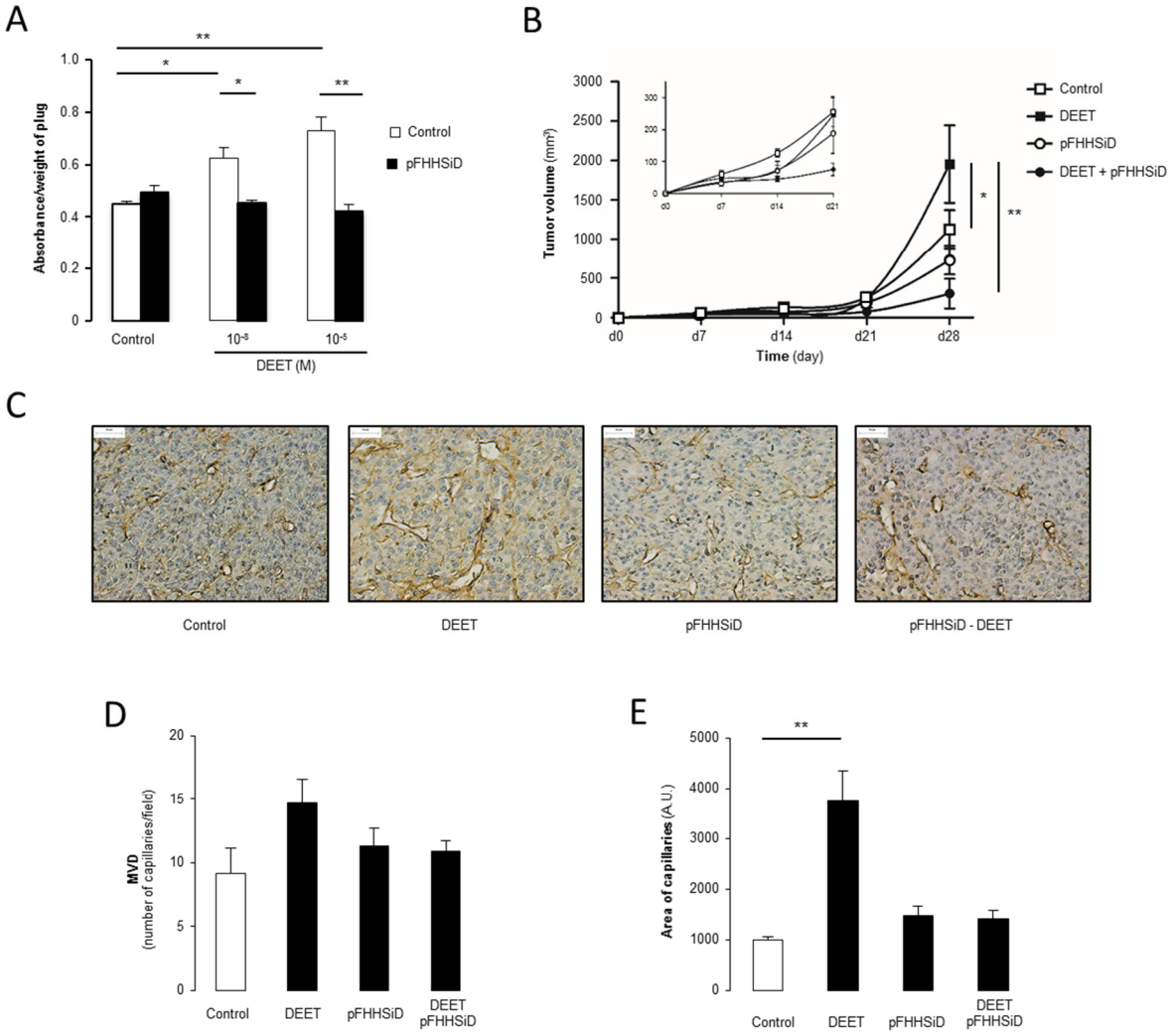


Figure 22 : Propriétés pro-angiogéniques du DEET *in vitro* et *in vivo*. n = 6, *p < 0,05 ; **p < 0,01.

b) Le DEET a un effet pro-angiogénique impliquant la voie M3 et inhibe l'activité de l'acétylcholinestérase

Afin de déterminer l'implication de la voie du récepteur M3 dans la prolifération induite par le DEET, les HUVECs ont été traitées avec du DEET (10^{-5} M et 10^{-8} M) en présence de pFHHSiD (10^{-7} M), un antagoniste sélectif de M3[196]. Le pFHHSiD prévient totalement l'augmentation de la prolifération du DEET pour chacune des deux concentrations testées (Tableau 2).

De plus, l'augmentation de la longueur des capillaires formés par les HUVECs en culture sur Matrigel® et induite par le DEET est également prévenue par le pFHHSiD (Figure 21,

CC BY NC ND

colonnes grises). La même expérience a été renouvelée avec des HUVECs transfectées avec un siRNA M3. En accord avec l'antagonisme de M3, la diminution de l'expression endothéliale de M3 permet de prévenir de l'effet pro-angiogénique du DEET *in vitro* (Figure 21, A colonnes noires). L'effet pro-angiogénique du DEET *in vitro* est donc sensible à un antagoniste sélectif de M3 et à un siRNA M3.

L'implication de la voie M3 dans l'effet du DEET a été confirmée *in vivo* chez la souris. Des cellules endothéliales murines traitées avec du DEET en présence ou non de pFHHSiD ont été mises en suspension dans du Matrigel® puis injectées en sous-cutanée à des souris. Le pFHHSiD permet de prévenir la néovascularisation induite par le DEET. L'antagonisme sélectif de M3 permet également de prévenir l'augmentation de la croissance tumorale induite par le DEET (Figures 22 A, B, C, D et E). En accord avec les résultats *in vitro*, l'effet pro-angiogénique du DEET *in vivo* est sensible à un antagoniste sélectif de M3.

L'AchE avait été préalablement identifiée comme étant une cible du DEET et les inhibiteurs de l'AchE tels que le donépézil ont des propriétés pro-angiogéniques *in vitro* et *in vivo*[141]. L'effet des deux concentrations de DEET sur l'activité de l'AchE a alors été évalué sur HUVECs. Le DEET, à 10^{-8} M et à 10^{-5} M inhibe l'activité endothéliale de l'AchE de façon similaire au contrôle positif BW284c51 (Figure 23). L'effet pro-angiogénique du DEET est donc associé à une diminution de l'activité de l'AchE.

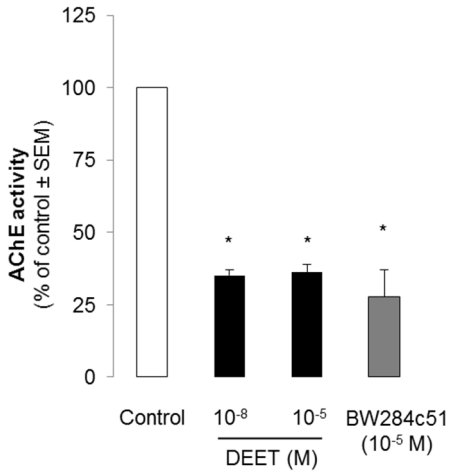


Figure 23 : Le DEET (10^{-8} M et 10^{-5} M) inhibe l'activité de l'AchE des cellules endothéliales. n = 4, *p < 0,05.

CC BY NC ND

c) Le DEET augmente la migration, l'adhésion et l'expression de marqueurs endothéliaux intervenant dans les processus angiogéniques

L'effet du DEET a alors été évalué sur les processus cellulaires impliqués dans l'angiogenèse tels que la migration et l'adhésion endothéliale. Le DEET, aux deux concentrations, augmente l'adhésion et la migration des HUVECs par un effet sensible au pFHHSiD (Tableau 3).

Tableau 3 : Le DEET augmente l'adhésion et la migration des cellules endothéliales *via* un effet sensible au pFHHSiD.

	DEET 10^{-8} M	DEET 10^{-5} M	pFHHSiD 10^{-7} M DEET 10^{-8} M	pFHHSiD 10^{-7} M DEET 10^{-5} M
Adhésion (% ctrl, m ± SEM)	139,85 ± 11,94*	142,45 ± 13,89*	94,81 ± 6,07	84,88 ± 7,58
Migration (% ctrl, m ± SEM)	122,08 ± 3,92*	133,75 ± 8,21*	47,70 ± 2,49*	79,74 ± 3,71*

n = 4, *$p < 0,05$

L'expression et l'activation de protéines impliquées dans les mécanismes d'adhésion et de migration de cellules endothéliales ont alors été étudiées à l'échelle moléculaire. Le DEET augmente la phosphorylation de FAK, sans en modifier son expression, par une voie sensible au pFHHSiD (Figure 24, A). De même, un marquage à la phalloïdine a confirmé la capacité du DEET à induire la formation de fibres de stress chez les HUVECs (Figure 24, B).

cc BY NC ND

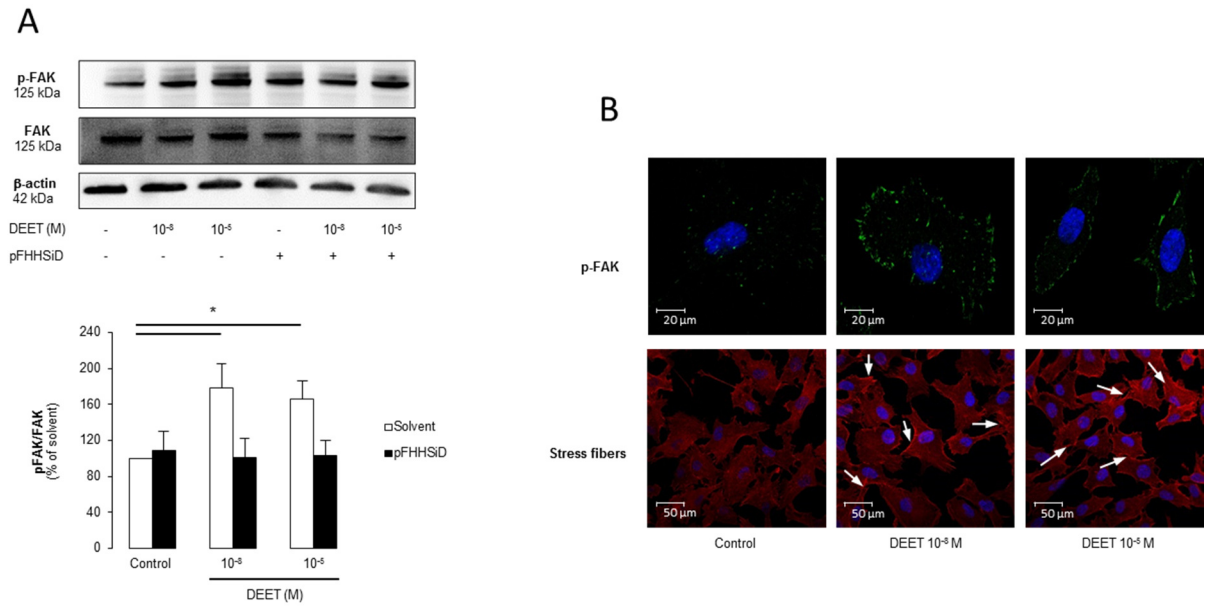


Figure 24 : Le DEET augmente la phosphorylation de FAK et induit la formation de fibres de stress. n = 4, *p < 0,05.

La production de NO par les HUVECs stimulées avec du DEET aux deux concentrations a été évaluée par RPE et la phosphorylation de la eNOS suite au traitement par le DEET a été évaluée par western blot. Le DEET augmente la production endothéliale de NO et augmente le rapport de phosphorylation de la eNOS en faveur d'une phosphorylation sur son site activateur en sérine 1177 (Figure 25, A et B). Or, la biodisponibilité du NO dépend de la présence d'anions superoxydes $O_2^{\bullet -}$. Afin de s'assurer que l'augmentation de la production du NO par le DEET n'était pas associée à une augmentation de la production d'$O_2^{\bullet -}$ diminuant ainsi sa biodisponibilité, la présence d'$O_2^{\bullet -}$ endothélial a été évaluée par RPE. Le DEET à 10^{-8} M et à 10^{-5} M n'induit pas d'augmentation de production d'$O_2^{\bullet -}$ (99,8 ± 8,9 % et 80,4 ± 11,4 % respectivement) chez les HUVECs. Enfin, le DEET augmente l'expression du VEGF chez les HUVECs, un facteur de croissance pro-angiogénique, mais cet effet est totalement aboli par la présence du pFHHSiD (Figure 25, C).

CC BY NC ND

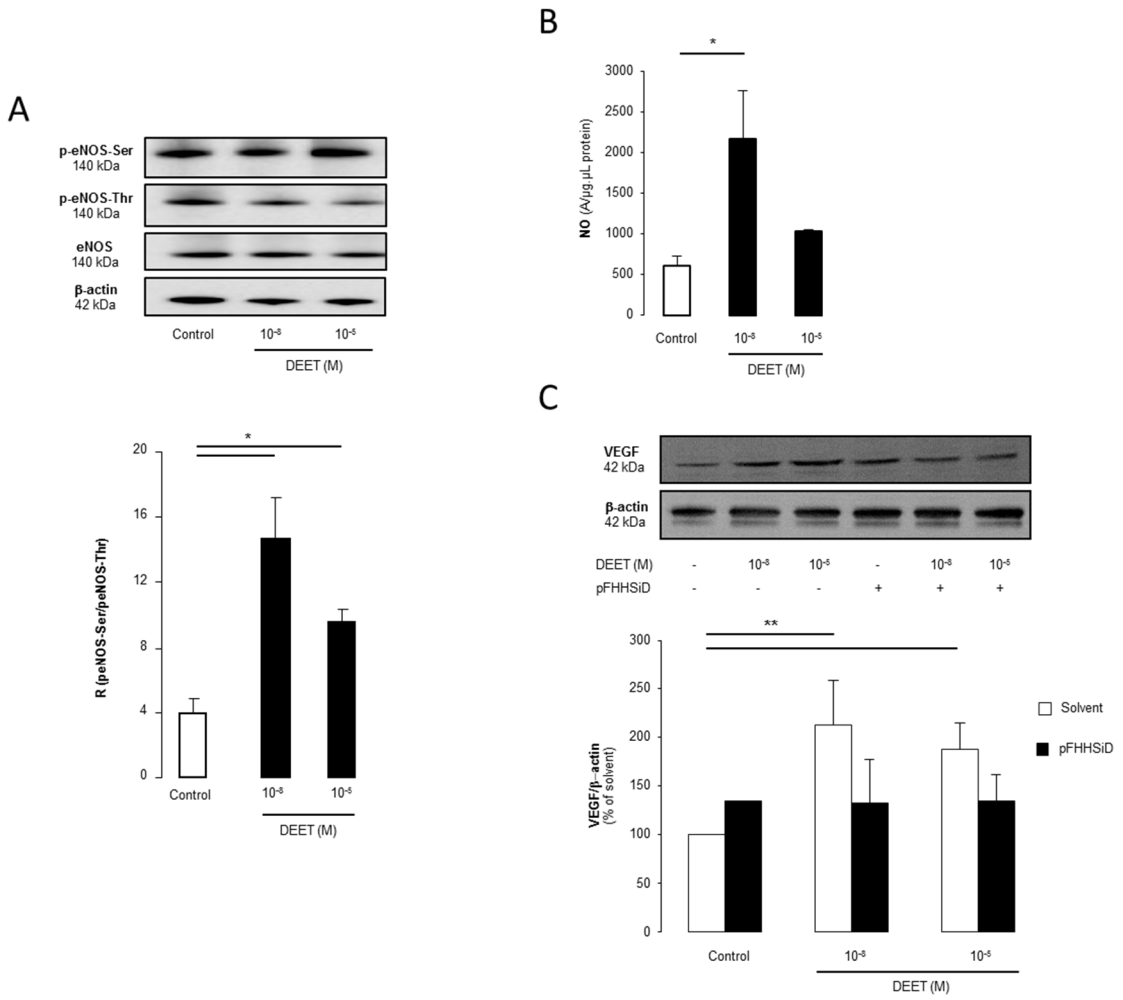


Figure 25 : Le DEET augmente l'expression et/ou la phosphorylation de marqueurs endothéliaux impliqués dans les processus angiogéniques.

n = 4 - 6, *p < 0,05 ; **p < 0,01.

En revanche, le DEET n'induit pas d'augmentation significative de l'expression du VEGF dans les tumeurs des souris *Nude* traitées tous les jours pendant 28 jours (Figure 26, A). De plus, aucune augmentation de l'expression de RhoA n'est également constatée chez des HUVECs traitées avec du DEET aux deux concentrations (Figure 26, B).

CC BY NC ND

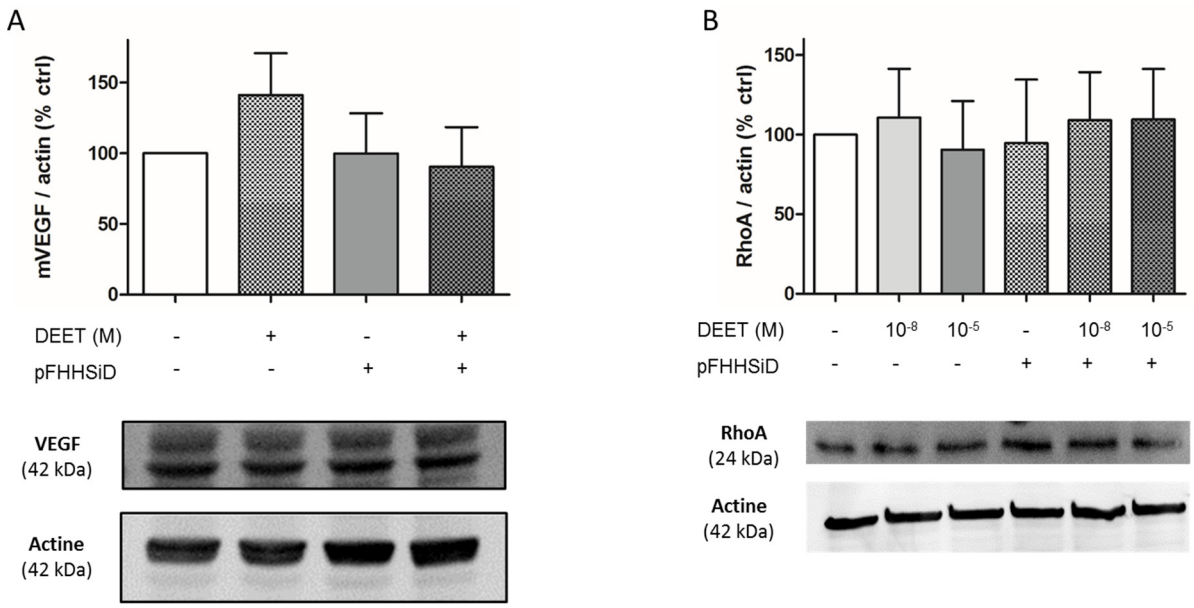


Figure 26 : Expression du VEGF murin dans les tumeurs des souris *Nude* traitées tous les jours pendant 28 jours avec du DEET (A) et expression de RhoA chez des HUVECs traitées avec du DEET (10^{-8} M et 10^{-5} M) (B). n = 3 - 6.

L'effet pro-angiogénique du DEET est donc associé à une augmentation de l'adhésion et de la migration endothéliale. Ces processus sont accompagnés d'une augmentation de la phosphorylation de FAK, de la production du NO et de l'expression du VEGF.

d) Le DEET est un modulateur allostérique de M3

La stimulation du récepteur M3 par un de ses ligands conduit à une libération du Ca^{2+} du RE vers le cytosol et à une activation de la cellule endothéliale et de ses voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse[203]. L'effet pro-angiogénique du DEET étant sensible à un antagoniste sélectif du récepteur M3 et/ou à un siRNA M3 au niveau endothélial, le signal calcique suite à une stimulation par le DEET a été évalué sur des HUVECs préalablement chargées avec la sonde calcique fluo-4. De façon surprenante, le DEET, aux deux concentrations, n'est pas capable d'induire de signal calcique chez les HUVECs (résultats non montrés). L'expérience renouvelée sur des cellules HEK 293 surexprimant de façon stable le récepteur humain M3 (HEK 296/M3) a engendré les mêmes résultats (Figure 27, A et B).

Cependant, les deux concentrations de DEET induisent un décalage vers la gauche de la courbe concentration-réponse du signal calcique induit par le carbachol, un agoniste muscarinique (Figure 27, C). De même, le DEET augmente avec une courbe « en cloche » la

cc BY NC ND

réponse calcique d'une même concentration de carbachol (10^{-8} M) (Figure 27, D). Ces résultats suggèrent que le DEET agit non pas comme un agoniste du récepteur M3 mais comme un modulateur de ce récepteur.

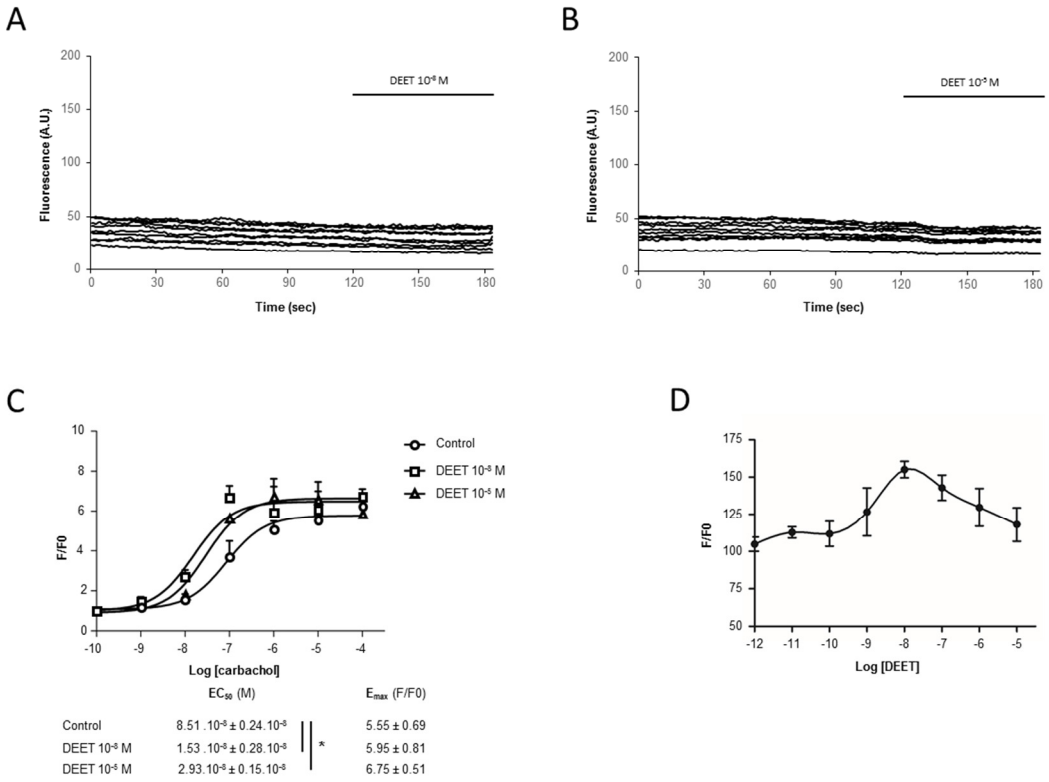


Figure 27 : Le DEET est un modulateur et non un agoniste du récepteur M3. n = 4 – 6, *p < 0,05.

Afin de confirmer ces résultats, une étude de binding du DEET a été réalisée sur cellules CHO surexprimant le récepteur M3 humain. Comme indiqué en Figure 28 (A), le DEET n'est pas capable de déplacer un radioligand marqué du site orthostérique de M3. De plus, les études de docking montrent très clairement des interactions possibles entre la molécule du DEET et le site allostérique de M3, confirmant ainsi l'hypothèse d'une modulation allostérique du DEET sur ce récepteur (Figure 28, B).

CC BY NC ND

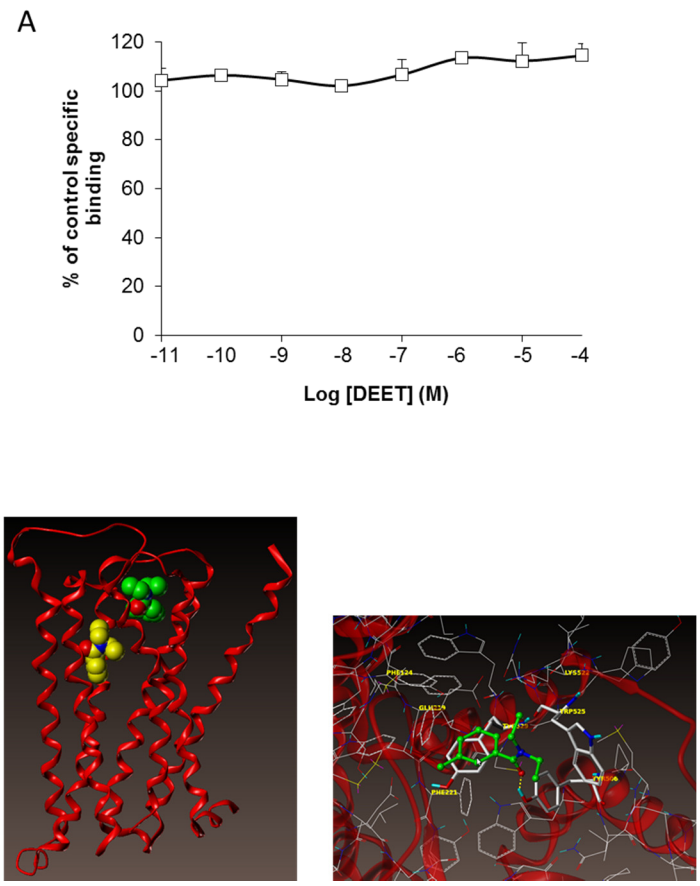


Figure 28 : Binding (A) et docking (B) du DEET sur le récepteur M3 suggérant une modulation allostérique de ce récepteur par le DEET.

CC BY NC ND

CC BY NC ND

4 – Discussion, conclusion et perspectives

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence un effet pro-angiogénique du DEET associé à une augmentation de la croissance tumorale *in vivo*. Cet effet pro-angiogénique est accompagné d'une augmentation de la prolifération, de la migration et de l'adhésion des cellules endothéliales, ainsi que d'une augmentation de la production du NO, de la phosphorylation de FAK et de l'expression endothéliale du VEGF. De plus, à l'échelle moléculaire, le DEET inhibe l'AchE et module le récepteur M3 *via* son site allostérique. Enfin, la diminution de l'expression endothéliale de M3 ou son antagonisme prévient l'effet pro-angiogénique du DEET *in vitro* et *in vivo* soulignant l'implication de la voie M3 dans l'angiogenèse induite par ce répulsif.

Après application cutanée, le DEET peut se retrouver dans la circulation générale notamment suite à son inhalation et/ou son passage de la barrière cutanée. La concentration plasmatique des sujets exposés au DEET dans ces conditions peut atteindre 10^{-5} M[116,117]. Du fait de sa forte utilisation et de son mésusage, le DEET est retrouvé dans l'eau des rivières et les nappes phréatiques à une concentration moyenne estimée à 10^{-8} M[87]. Les expériences ont ainsi été réalisées avec ces deux concentrations, 10^{-8} M et 10^{-5} M.

La présence du DEET dans l'environnement conduit inévitablement à sa présence dans l'eau du robinet et même dans l'eau potable de certaines régions[204]. Même si les concentrations sont très faibles, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle la présence quasi ubiquitaire et permanente du DEET dans l'environnement peut mener indirectement à son exposition en chronique chez l'Homme.

Il a été montré que l'exposition chronique au DEET était associée à une augmentation du risque d'être atteint de cancer[138]. Cette étude cas-témoins n'a cependant jamais été confirmée et n'est pas en accord avec les données de la littérature chez l'animal montrant une absence de carcinogénicité du DEET même après 18 mois de traitement quotidien[140]. Le DEET ne serait donc probablement pas cancérigène ni en exposition aiguë, ni en exposition chronique. En accord avec ces derniers résultats, aucune modification de la prolifération des cellules tumorales U87MG et B16F12 n'a été retrouvée pour chacune des concentrations de DEET, ce qui n'est en revanche pas le cas pour les cellules endothéliales. L'expérience sur souris *Nude* xenogreffées avec des U87MG et traitées tous les jours avec du DEET permet de confirmer *in vivo* qu'au sein d'une tumeur solide, le DEET cible préférentiellement les cellules endothéliales en induisant l'angiogenèse conduisant *in fine* à une augmentation de la croissance tumorale. Il

CC BY NC ND

aurait été intéressant dans ce modèle de confirmer l'absence de modification de la prolifération des cellules tumorales à l'aide par exemple d'un immuno-marquage sur des coupes des tumeurs de Ki67, une protéine surexprimée lorsque les cellules sont en phase proliférative[205]. Il serait également intéressant de confirmer *in vivo* ces résultats avec d'autres modèles de cellule tumorale tels que les cellules de carcinome pulmonaire de Lewis LL/2 qui forment une tumeur vascularisée[206] ou encore les cellules de mélanome humain A-375 compte tenu de l'application cutanée du DEET.

L'effet pro-angiogénique du DEET est également associé à une augmentation de la migration et de l'adhésion des HUVECs, processus cellulaires impliqués dans l'angiogenèse. Ces processus sont également associés à une augmentation de la production du NO, de la phosphorylation de FAK et de l'expression du VEGF au niveau endothélial. En revanche, le DEET n'augmente pas l'expression endothéliale de RhoA, une protéine pourtant bien connue pour être impliquée dans les processus angiogéniques au niveau endothélial et généralement associée à une augmentation du stress des fibres et de la phosphorylation de FAK[207]. Cependant, RhoA est une GTPase directement liée à la membrane plasmique. Ainsi, il aurait été préférable d'évaluer l'expression de RhoA en western blot à partir des protéines isolées de la membrane plasmique des HUVECs et non sur les protéines totales. De plus, l'expression de GTP-RhoA, la forme active de RhoA n'a pas été évaluée. Il aurait donc été intéressant d'évaluer l'expression de GTP-RhoA par rapport à l'expression totale de RhoA à partir de fractions protéiques issues de la membrane plasmique des HUVECs traitées ou non avec du DEET.

De même, aucune augmentation significative de l'expression du VEGF n'est constatée à partir des protéines extraites des tumeurs des souris traitées ou non avec du DEET. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'augmentation de la production endothéliale de VEGF induite par le DEET ne serait pas visible à partir de protéines extraites des tumeurs entières. L'isolation des cellules endothéliales à partir des tumeurs aurait pu permettre de confirmer *in vivo* l'augmentation spécifiquement endothéliale de la production de VEGF suite à une exposition au DEET. Une autre explication pourrait être que la sécrétion du VEGF par les cellules endothéliales pourrait avoir lieu à un stade plus précoce, durant les premiers jours de traitement du DEET.

Les cibles du DEET chez l'insecte responsables de son activité répulsive font encore aujourd'hui l'objet de nombreux débats. De nombreux récepteurs ont déjà été identifiés dans différents modèles suggérant un mode d'action multi cible du DEET. Chez l'Homme, plusieurs effets indésirables ont également été remarqués et l'AchE a clairement été identifiée par binding

cc BY NC ND

comme une cible du DEET[98]. Ainsi, l'effet du DEET sur l'activité de l'AchE sur cellule endothéliale a été évalué. Le DEET, aux deux concentrations 10^{-8} M et 10^{-5} M, inhibe l'AchE endothéliale de 65 % et 64 % respectivement. Ces résultats concordent également avec les résultats montrant un effet pro-angiogénique des inhibiteurs de l'AchE[141,142].

De plus, le DEET est également suspecté d'agir sur le récepteur M3 et plus précisément sur son site allostérique. Afin de vérifier cette hypothèse, le pFHHSiD, un antagoniste sélectif de M3[196] a été utilisé ainsi qu'un siRNA M3 afin de diminuer l'expression de ce récepteur chez les HUVECs. L'effet pro-angiogénique du DEET, *in vitro* comme *in vivo* ainsi que la prolifération, l'adhésion, la migration et l'augmentation de l'expression du VEGF des cellules endothéliales sont totalement prévenues par le pFHHSiD et/ou un siRNA M3. Ces observations confirment l'implication de la voie M3 dans l'effet pro-angiogénique du DEET.

Pour étudier plus en détail les interactions existant entre la molécule de DEET et le récepteur M3, le signal calcique des HUVECs et des HEK/M3 en réponse à une stimulation au DEET a été évalué. Le DEET n'induit pas d'augmentation de la concentration calcique intra-cytosolique dans ces deux modèles cellulaires mais il potentialise la réponse calcique au carbachol, un agoniste muscarinique dérivé de l'Ach et non dégradé par l'AchE. Cette expérience démontre clairement un effet modulateur sur site allostérique et non agoniste à partir du site orthostérique. L'essai de binding conforte d'ailleurs ces résultats car le DEET ne déplace pas un radioligand marqué du site orthostérique de M3. Le docking permet également de mettre en évidence des interactions possibles entre la molécule de DEET et le site allostérique de M3. Ces derniers résultats confirment ainsi les hypothèses préalablement formulées dans la littérature concernant la modulation allostérique de M3 par le DEET[99].

L'ensemble de tous ces résultats permet donc d'affirmer que le DEET, en inhibant l'AchE d'une part, et d'autre part, en modulant le récepteur M3, augmente le signal calcique induit par l'Ach et active la cellule endothéliale menant ainsi à un effet pro-angiogénique (Figure 29).

CC BY NC ND

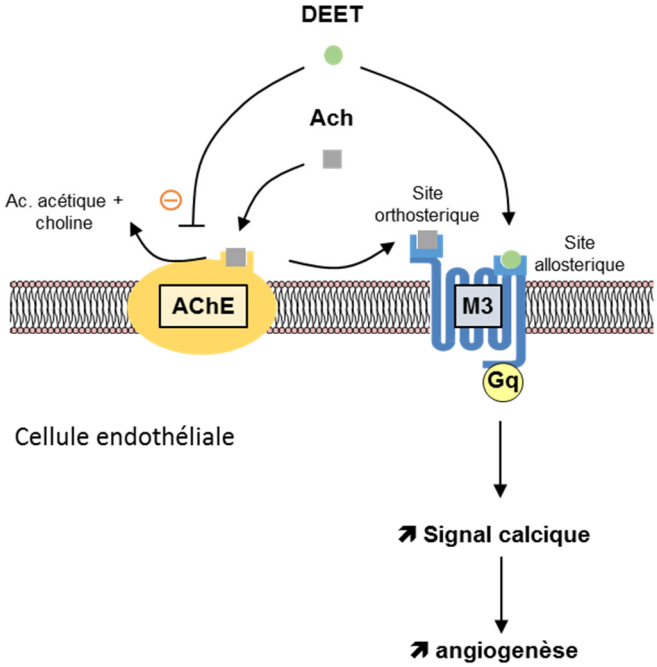


Figure 29 : Mécanisme d'action du DEET sur la cellule endothéliale responsable de son effet pro-angiogénique.

Ces travaux ont été réalisés chez la souris *Nude* xénogreffée avec des cellules tumorales humaines et sur cellules endothéliales primaires humaines. L'idéal serait maintenant de confirmer ces données chez l'Homme en utilisation réelle. Cependant, il apparait difficile d'étudier l'angiogenèse chez des sujets sains et une étude interventionnelle de type exposés – non exposés chez des patients atteints de cancer est éthiquement infaisable au regard des résultats obtenus chez l'animal. Des études épidémiologiques, dans l'idéal longitudinales et prospectives associant le dosage plasmatique du DEET et la croissance tumorale voire le temps d'apparition de rechute pourraient permettre de répondre à cette problématique. Néanmoins, étant donnés les résultats observés sur cellules primaires humaines et sur animal, le principe de précaution pourrait être appliqué pour les patients atteints de cancer solide et souhaitant utiliser un répulsif anti-moustiques.

Une autre solution serait de trouver une concentration plasmatique maximale en DEET dénuée d'effet pro-angiogénique. Lorsque des HUVECs sont traitées avec une gamme de concentration de DEET et mises en culture sur Matrigel® de façon à évaluer la formation des capillaires, un effet pro-angiogénique du DEET n'est retrouvé qu'à partir de 10^{-8} M. Ainsi, 10^{-}

CC BY NC ND

^{9} M est la concentration maximale en DEET n'induisant pas d'effet pro-angiogénique *in vitro* (Figure 30). La confirmation de ces résultats *in vivo* permettrait de définir un seuil de concentration plasmatique en DEET à ne pas dépasser. Ainsi, des études précises de pharmacocinétique du DEET chez l'Homme permettraient de définir une concentration maximale en DEET dans les produits commercialisés ainsi qu'une aire et une fréquence d'application maximales à ne pas dépasser afin de ne pas atteindre le seuil de 10^{-8} M de DEET en concentration plasmatique.

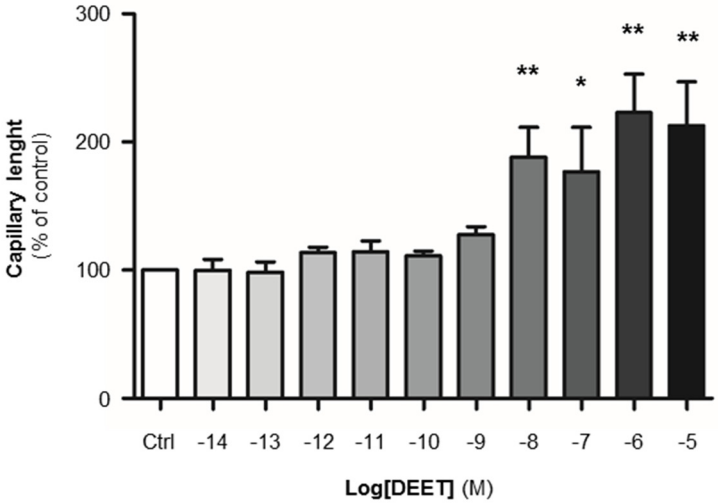


Figure 30 : Longueur des capillaires formés par les HUVECs après traitement par des concentrations croissantes du DEET. n = 6, *p < 0,05 ; **p < 0,01.

Ces conditions d'application permettraient également de diminuer l'utilisation de ce répulsif limitant ainsi sa présence dans l'environnement. Ceci permettrait alors non seulement de diminuer les expositions chroniques dues à la présence du DEET dans les eaux notamment potables mais également de diminuer l'apparition de résistances des moustiques pour ce répulsif.

La révision des formulations galéniques dans le but de diminuer le passage cutané du DEET tout en maintenant son activité répulsive contre les moustiques pourrait également être une solution. Il a d'ailleurs déjà été montré par exemple que la microencapsulation du DEET permettait de diminuer son absorption cutané et augmentait sa durée d'action répulsive contre les moustiques[125,208].

CC BY NC ND

Enfin, le DEET pourrait être associé aux autres répulsifs et notamment à l'IR3535 et à l'icaridine (ou KBR3023) ou à des insecticides organophosphates comme le pyrimiphos dans le but d'induire une synergie des effets répulsifs tout permettant ainsi de réduire les doses utilisées[209–211]. En effet, il a été montré que ces associations permettent de diminuer les concentrations respectives de chacun des produits et évitent l'apparition des résistances.

Une chose est certaine, l'utilisation du DEET chez l'Homme doit aujourd'hui être réévaluée. Il est clair que le DEET, avec l'utilisation de moustiquaires imprégnées et la pulvérisation d'insecticides rémanents dans les habitations, constitue un atout indispensable pour la lutte contre les maladies vectorielles. Cependant, les données de la littérature montrant l'apparition d'effets secondaires suite à son utilisation sont de plus en plus nombreuses[98,130,131,212] tout comme les données montrant les difficultés à épurer cette molécule des eaux potables[213–215]. De plus, les paramètres pharmacocinétiques de cette molécule chez l'Homme doivent être précisés. Ces études fourniraient alors des méthodes permettant de vérifier que les conditions d'utilisation de ces produits ne permettent pas d'atteindre des taux plasmatiques en DEET susceptibles d'entrainer des effets secondaires chez l'Homme.

CC BY NC ND

DEUXIEME ETUDE : ROLE DE PTP1B ET DU STRESS DU RE DANS LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE INDUITE PAR LE DIABETE

1 - Résultats préliminaires

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle PTP1B serait directement régulée au niveau endothéliale par la glycémie et que le stress du RE pourrait être impliqué dans cette régulation, dans un premier temps, la quantité d'ARN messager (ARNm) et de protéine correspondant à PTP1B et aux marqueurs du stress du ER tels que CHOP, GRP78, XBP1 et *spliced* XBP1 (spl XBP1) ont été évaluées par RTqPCR ainsi que par WB dans des vaisseaux (veine et aorte) de patients diabétiques et comparées à celle des patients non diabétiques. Comme le montre la figure 31, le diabète chez l'Homme est associé à une augmentation des ARNm et de l'expression de PTP1B et des marqueurs du stress du RE au niveau vasculaire.

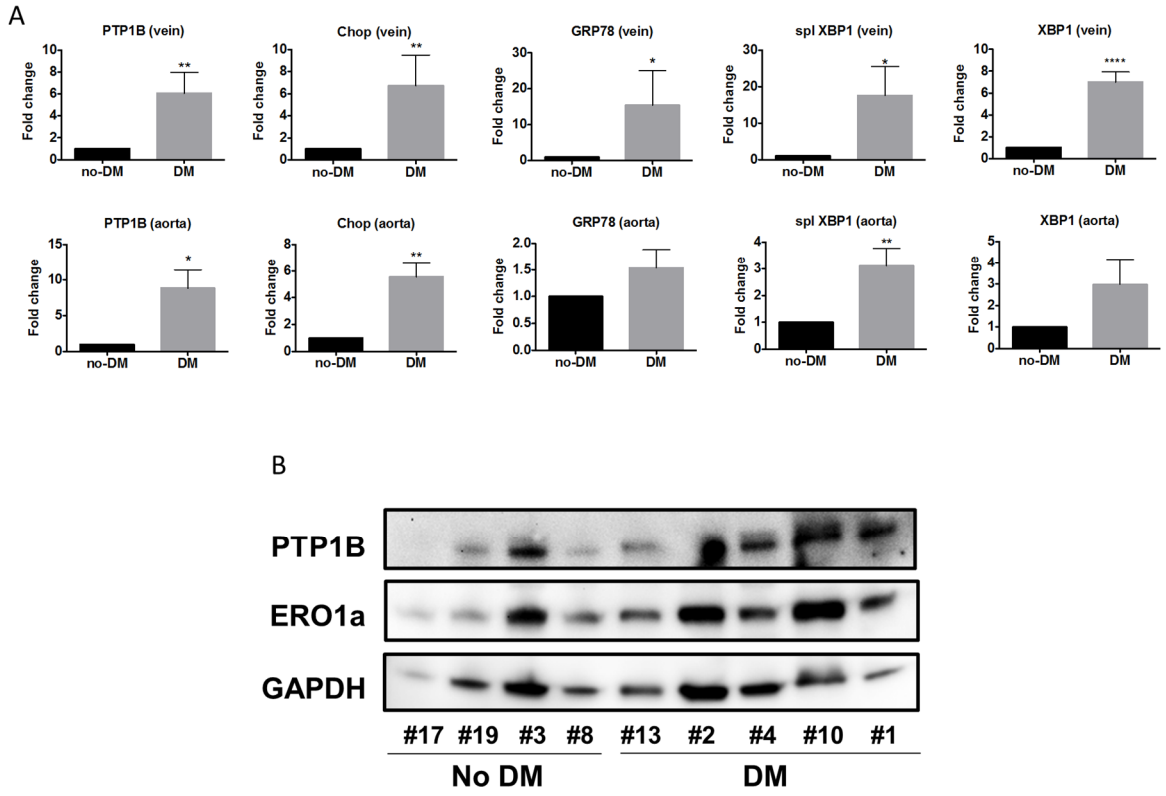


Figure 31 : Les patients diabétiques présentent une augmentation de la quantité d'ARNm et de l'expression de PTP1B et des marqueurs du stress du RE au niveau vasculaire comparés aux non diabétiques. n = 6, *p < 0,05 ; **p < 0,01.

CC BY NC ND

Chez la souris, le traitement à la STZ les rendant ainsi diabétiques induit une augmentation de l'expression de PTP1B dans l'aorte thoracique par rapport aux souris non traitées. Ces données sont en accord avec les données retrouvées chez l'Homme confirmant ainsi ce modèle animal pour cette étude (Figure 32).

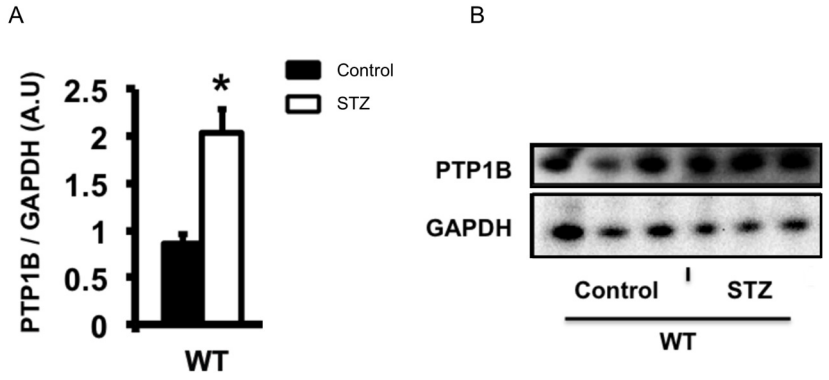


Figure 32 : Les souris diabétiques présentent une augmentation vasculaire de l'expression de PTP1B par rapport aux souris contrôles. n = 10, *p < 0,05.

De plus, il a été mis en évidence une augmentation des ARNm des marqueurs du stress du RE dans l'aorte d'un autre modèle de souris rendues diabétiques par mutation du récepteur à la leptine (souris *db/db*), par rapport aux souris non mutées. Comme précédemment, ces résultats sont en accord avec les données chez l'Homme. De façon intéressante, les souris *db/db* présentent également au niveau vasculaire une augmentation de l'ARNm codant pour p53, une protéine impliquée dans l'initiation de l'apoptose (Figure 33).

CC BY NC ND

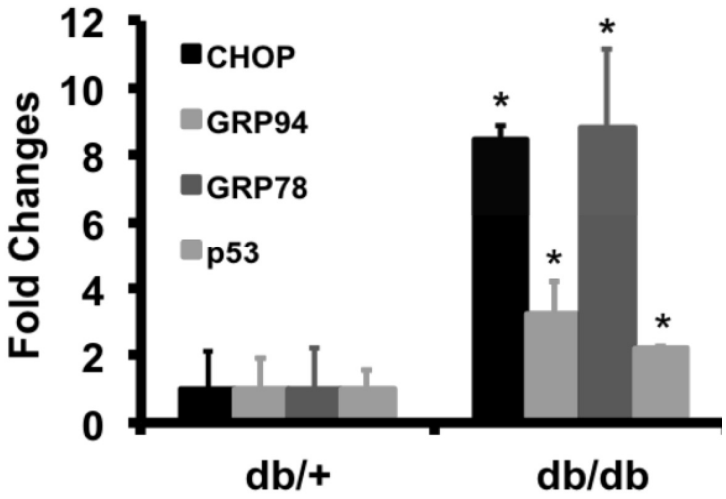


Figure 33 : Les souris *db/db* présentent une augmentation des ARNm codant pour des protéines du stress du RE et pour l'apoptose par rapport aux souris hétérozygotes db/+. n = 6, *p < 0,05.

Afin de préciser si cette augmentation de PTP1B et des marqueurs du stress du RE ont lieu spécifiquement au niveau de l'endothélium, des cellules endothéliales d'aorte humaine (HAECs) ont été traitées ou non pendant 5 jours avec une concentration en glucose de 25 mM. Cette forte concentration de glucose induit une augmentation de l'expression de PTP1B, de GRP78 et de ERO1α (Figure 34). Cependant, le lien entre PTP1B et le stress du RE en conditions hyperglycémiques et leur implication dans la dysfonction endothéliale reste à démontrer.

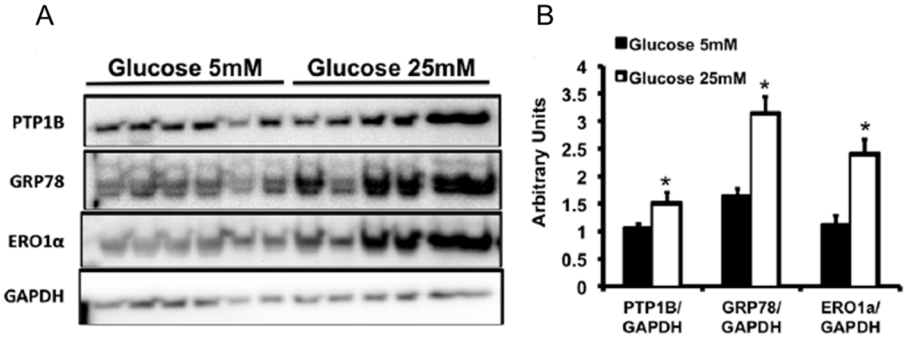


Figure 34 : Augmentation de l'expression de PTP1B, GRP78 et de ERO1α chez des HAECs traitées pendant 5 jours avec une concentration en glucose de 25 mM par rapport aux HAECs non traitées. n = 6, *p < 0,05.

CC BY NC ND

2 - Objectifs de l'étude

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'implication de PTP1B et du stress du RE ainsi que leurs interactions dans la dysfonction endothéliale induite par l'hyperglycémie dans le cadre du DT1.

3 - Méthodes

Culture de cellules endothéliales

Les HUVECs (*Human Umbilical Venous Endothelial Cells*) proviennent de cordons ombilicaux des deux sexes (Lonza®) et ont été mises en culture dans des flasques T75 Corning® dans du milieu EGM-2 (Lonza®) contenant 8 % de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco®). Elles ont été utilisées entre leur 4ème et leur 8ème passage après incubation dans une atmosphère contrôlée à 37 °C avec 5% de CO_2 et saturée en H_2O. Une fois à confluence, les cellules ont été, ou non, transfectées avec un siRNA PTPT1B ou contrôle (Ambion, life technologies) avec de la Lipofetamine (invitrogen, life technologies) dans du milieu Opti-MEM (Lonza) pendant 24 h. 3 jours après, les cellules ont été traitées avec de l'EGM-2 contenant 2 % de SVF et 25 mM de glucose (high glucose HG) ou 5 mM de glucose et 20 mM de mannitol (contrôle osmotique, OC) pendant 5 jours avec un changement de milieu tous les 2 jours.

Modèles animaux

Les souris PTP1B ECKO (C57Bl6) proviennent de l'Université de Yale et ont été généreusement fournies par le Dr Michael Simons. Le KO de PTP1B spécifique de l'endothélium a été induit par des injections en intrapéritonéale de 2mg/j pendant 5 jours de tamoxifène préalablement dissout dans de l'huile de maïs. Les souris ont été traitées à l'âge de 4 – 6 semaines et utilisées après une période de 2 semaines suivant le dernier traitement.

Les souris Akita (C57Bl6) proviennent des laboratoires Jackson et ont été utilisées à l'âge de 10 semaines.

Les souris PTP1B KO (Balb/c) ainsi que leurs contrôles proviennent de l'Université de McGill et ont été généreusement fournies par le Dr Michel Tremblay.

Les animaux ont été élevés dans une atmosphère tempérée (22 ± 2 °C) avec un cycle de lumière et d'obscurité toutes les 12 h et nourris avec de la nourriture standard et de l'eau *ad libitum* au sein de l'animalerie de l'Université d'Augusta (Géorgie, USA).

CC BY NC ND

Traitement à la streptozotocine (STZ)

Le DT1 a été induit avec 50 mg/kg/j pendant 5 jours de STZ en intrapéritonéale chez les souris PTP1B ECKO. La STZ a été injectée 2 semaines après la dernière injection de tamoxifène et les souris ont été utilisées après une période de 2 semaines suivant la dernière injection de STZ. L'induction du DT1 a été confirmée par une glycémie supérieure à 2,40 g/l.

Myographie

Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane 5 % puis sacrifiées par décapitation. Le sang a été collecté et l'aorte thoracique a été prélevée, disséquée de façon à enlever tout le tissu adipeux puis coupée en anneaux de 2 mm. Ces anneaux ont ensuite été montés sur un myographe (DMT, Aarhus, Denmark) et équilibrés pendant 45min à une pré-tension de 1g. La fonction endothéliale a été évaluée par des courbes concentration-réponse à l'Ach (10^{-9} M à 10^{-5} M) après obtention d'un plateau de contraction à la sérotonine (5-HT, 10^{-6} M). L'implication du NO et des prostaglandines ont été évaluées en renouvelant l'expérience en présence de l'inhibiteur de eNOS N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) et/ou d'indométhacine à la concentration de 10^{-4} M. En fin d'expérience, la relaxation indépendante de l'endothélium a été évaluée avec des concentrations-réponse au nitroprussiate de sodium (SNP, 10^{-10} M à 10^{-5} M). Les réponses ont été exprimées en pourcentage de contraction au 5-HT.

Western blots

Après 5 jours de traitement, les protéines des HUVECs ont été extraites avec une solution de Laemmli contenant 5 % de β-mercapto-éthanol (β-ME). Les protéines des aortes de souris ont été extraites après pulvérisation dans l'azote liquide de l'aorte avec un tampon RIPA et du Laemmli contenant 5 % de β-ME. Les protéines ont ensuite été migrées sur un gel SDS-PAGE et transférées sur une membrane en PVDF. Après saturation pendant 1h à l'aide de protéines de lait à 5 % dans du TBS-T, la membrane a été incubée pendant la nuit à 4 °C et sous agitation avec les anticorps dirigés contre PTP1B (humain : BD bioscience, souris : ABCam), phospho-AMPK et AMPK (Cell signaling), GRP78 (ABCam), ERO1α (Santa Cruz) et GAPDH (Santa Cruz).

RTqPCR

Les ARN totaux des HUVECs ont été extraits, purifiés et élués sur une colonne PureLink® RNA (Ambion, life technologies) et la concentration en ARN a été établie avec un NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies). L'ADN complémentaire a été généré par RT-PCR avec un kit

CC BY NC ND

de reverse transcription (High capacity cDNA reverse transcription kit, Thermo Fisher Scientific) et la RT-PCR quantitative en temps réel a été réalisée avec du SYBR-Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) à l'aide des primers suivants :

PTP1B humain :	Fw 5' GCG GCC ATT TAC CAG TTG AC 3'
	Rv 5' GAC GAC ACC CCT GCT TTT CT 3'
PTP1B murin :	Fw 5' GGA GCA TAG GAC AGT GGT AAT 3'
	Rv 5' CTA ACT CAC AGG GAA AGC AGA 3'
18S :	Fw 5' TCG AGG CCC TGT AAT TGG AA 3'
	Rv 5' CCC TCC AAT GGA TCC TCG TT 3'

CC BY NC ND

4 - Résultats

1) Akita mice

L'implication de PTP1B et du stress du RE dans la dysfonction endothéliale a été évaluée dans un autre modèle murin du DT1, chez les souris Akita. Les souris hétérozygotes Akita, de souche C57Bl6, comportent une mutation au niveau du gène codant pour l'insuline (*Ins2*)[216]. Les principaux symptômes du DT1 tels que l'hyperglycémie, l'hypoinsulinémie, la polydipsie et la polyurie sont retrouvés chez ces souris après l'âge de 3 semaines. Le phénotype diabétique est plus sévère chez les mâles par rapport aux femelles. Chez la souris, un diabète est considéré pour une glycémie supérieure à 240 mg/dl[176]. Les résultats de la glycémie pour les souris Akita sont présentés dans le tableau 4. Ces résultats confirment le DT1 chez les souris Akita mâles et le phénotype diabétique plus important chez les mâles par rapport aux femelles.

Tableau 4 : Glycémie des souris Akita mâles et femelles par rapport aux souris contrôles.

	Age (semaine)	Glycémie (mg/dl)
Souris contrôle femelle (n = 2)	5	146.5
Akita femelle (n = 4)	8 - 19	197,5 ± 5,9
Souris contrôle mâle (n = 9)	8 - 10	140,7 ± 11,5
Akita mâle (n = 4)	8 - 10	438,0 ± 13,8

La fonction endothéliale a ensuite été évaluée par myographie chez les souris Akita mâles et comparée par rapport aux souris contrôles mâles. Le phénotype diabétique Akita semble associé à une diminution de la relaxation induite par l'Ach sans affecter la relaxation indépendante de l'endothélium induite par le SNP (Figure 35).

CC BY NC ND

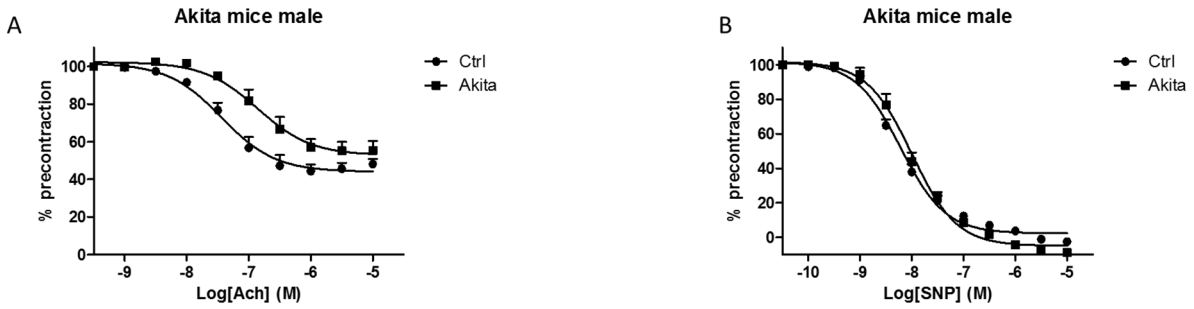


Figure 35 : Courbes de relaxation à l'Ach (A) et au nitroprussiate de sodium (SNP) (B) d'anneaux d'aortes de souris Akita mâles (carré noir) et de souris contrôles (rond noir). n = 3 - 5.

L'expression de GRP78, un marqueur du stress du RE et de PTP1B dans l'aorte de ces souris, a également été évaluée par Western Blot. Comme indiqué en figure 36, les souris Akita mâles semblent présenter une augmentation de GRP78. Concernant PTP1B, les résultats semblent moins clairs mais laissent suggérer une petite augmentation.

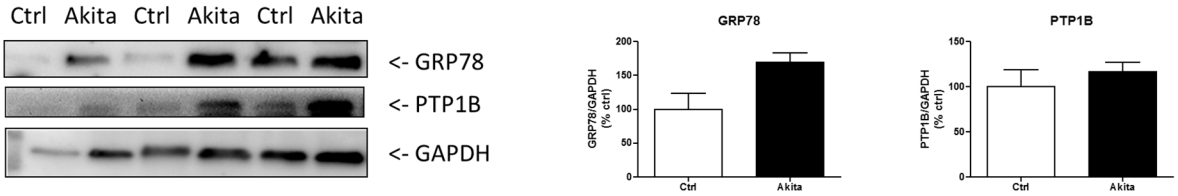


Figure 36 : Augmentation de l'expression de GRP78 mais pas de PTP1B dans l'aorte des souris Akita mâles par rapport aux souris contrôles. n = 3.

Ces résultats préliminaires suggèrent donc que les souris mâles Akita présenteraient une dysfonction endothéliale associée à une augmentation de GRP78 au niveau vasculaire.

CC BY NC ND

2) Implication de PTP1B et du stress du RE au niveau endothélial sous l'influence de l'hyperglycémie

Afin d'étudier plus en détail le rôle de PTP1B dans l'endothélium en condition diabétique, des souris KO pour PTP1B spécifiquement au niveau endothélial (PTP1B ECKO) ont été traitées par de la STZ. Deux semaines après la dernière injection, ces souris présentent une hyperglycémie. Tableau 5.

Tableau 5 : Glycémie des souris PTP1B ECKO deux semaines après la dernière injection de STZ.

	Age (semaine)	Glycémie (mg/dl)
ECKO WT (n = 3)	8 - 10	449,7 ± 95,5
ECKO KO (n = 4)	8 - 10	531,8 ± 36,3

La fonction vasculaire de ces souris a ensuite été évaluée par myographie grâce à des courbes de concentrations – réponses à l'Ach ou au SNP et comparées par rapport à des souris ECKO non traitées. L'utilisation d'un inhibiteur de eNOS (L-NAME) et/ou des COXs (indométacine) a permis d'apprécier l'implication du NO, des prostaglandines et de l'EDHF dans cet effet. La délétion spécifique de PTP1B dans les cellules endothéliales ne semble pas modifier la relaxation induite par l'Ach (Figure 37, A). En revanche, le traitement à la STZ induirait une dysfonction endothéliale qui serait prévenue par la délétion de PTP1B spécifiquement au niveau de l'endothélium (Figure 37, B). Aucune différence n'est constatée pour les relaxations au SNP pour toutes les conditions (Figure 37, C et D). De plus, pour les souris traitées au STZ, la présence d'indométacine seule semble augmenter légèrement la relaxation induite par l'Ach pour les deux groupes tandis que la présence de L-NAME seul abolirait la différence de relaxation à l'Ach entre les souris WT et les souris dont PTP1B a été spécifiquement délété au niveau endothélial (Figure 37, E). Cependant, la présence à la fois d'indométacine et de L-NAME chez les souris traitées au STZ ne semble pas abolir totalement la dysfonction endothéliale induite par le STZ (Figure 37, E). Ainsi, ces résultats préliminaires suggèrent que la délétion spécifiquement endothéliale de PTP1B permettrait de prévenir la dysfonction endothéliale induite par le STZ et que cette délétion impliquerait à la fois le NO et un autre facteur dérivé de l'endothélium.

cc BY NC ND

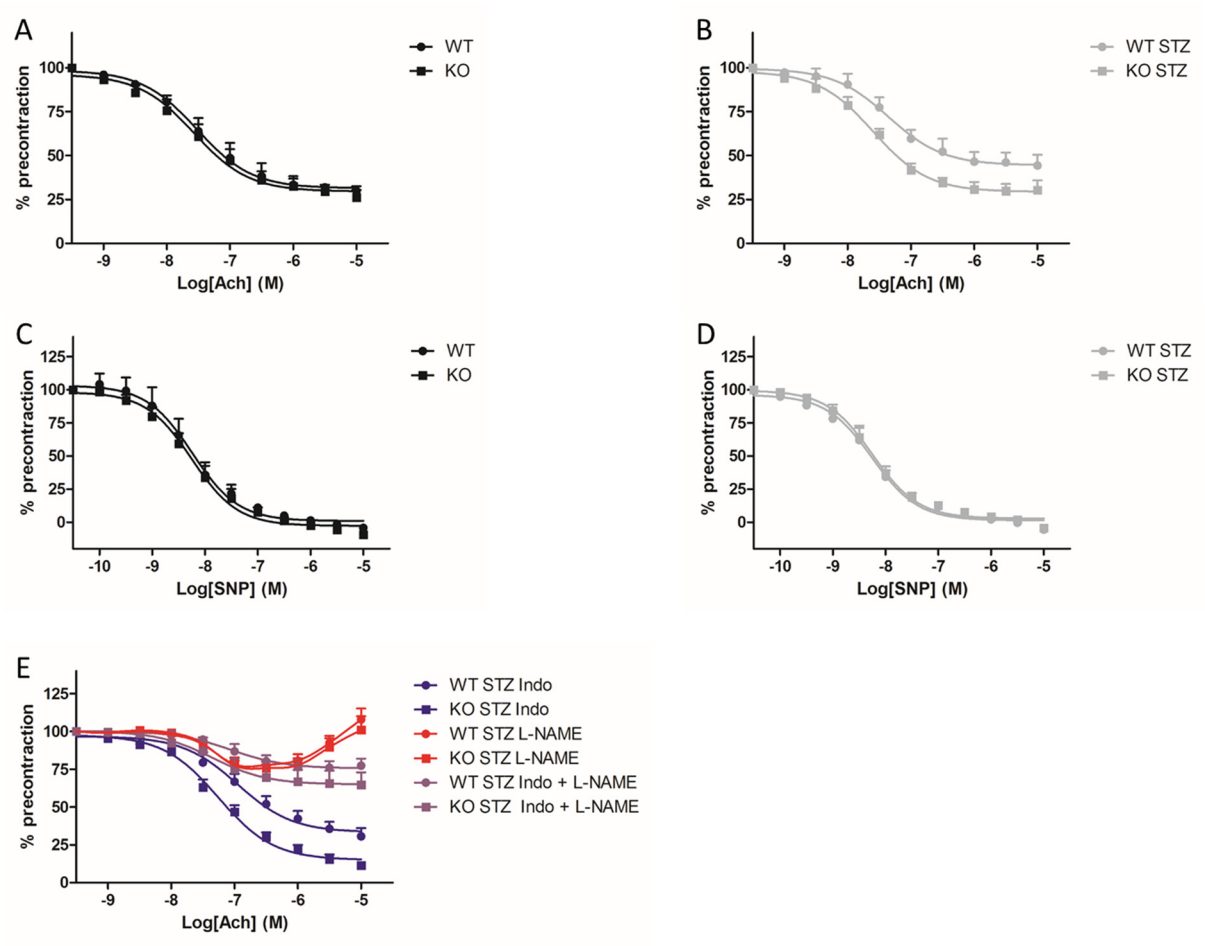


Figure 37 : La délétion spécifique de l'endothélium de PTP1B préviendrait de la dysfonction endothéliale induite par la STZ. Cet effet apparait sensible à la présence de L-NAME mais pas d'indométacine. n = 3 - 4.

L'implication de PTP1B et des marqueurs du stress du RE a ensuite été évaluée *in vitro* chez des HUVECs transfectées ou non avec un siRNA contrôle ou PTP1B puis traitées pendant 5 jours avec 5 ou 25 mM de glucose. Afin d'évaluer l'effet du changement d'osmolarité, les HUVECs ont également été traitées avec 5 mM de glucose et 20 mM de mannitol (contrôle osmotique, OC). L'efficacité de la transfection a été appréciée par PCR quantitative ainsi que par Western Blot. Comme présenté en figures 38 et 39, la transfection diminue de plus de 60% l'expression de PTP1B.

CC BY NC ND

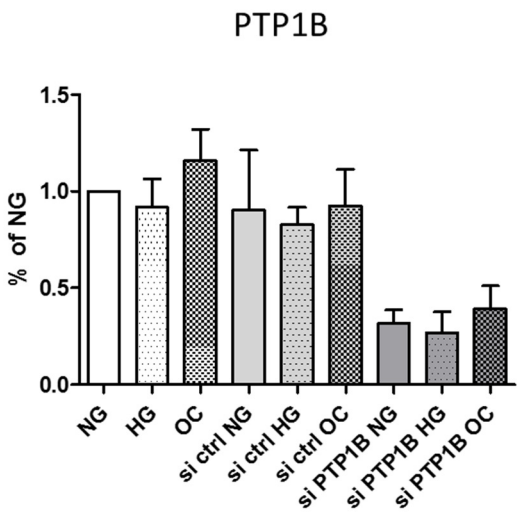


Figure 38 : La transfection des HUVECs avec un siRNA PTP1B diminue la quantité des ARNm codant pour PTP1B. NG : *normal glucose* (5 mM), HG : *high glucose* (25 mM), OC : *osmotic control* (5 mM glucose et 20 mM mannitol). n = 4.

Cependant, aucune augmentation de l'expression de PTP1B et de GRP78 ne semble apparaître sous l'effet de la forte concentration de glucose pendant 5 jours chez les HUVECs (Figure 39). En revanche, la diminution de l'expression de PTP1B par la transfection avec le siRNA PTP1B serait associée à une augmentation de l'expression d'AMP-activated protein kinase (AMPK) et ce, indépendamment des concentrations en glucose ou en mannitol. Aucune modification significative de la phosphorylation d'AMPK ne semble cependant retrouvée pour toutes les conditions.

BY NC ND

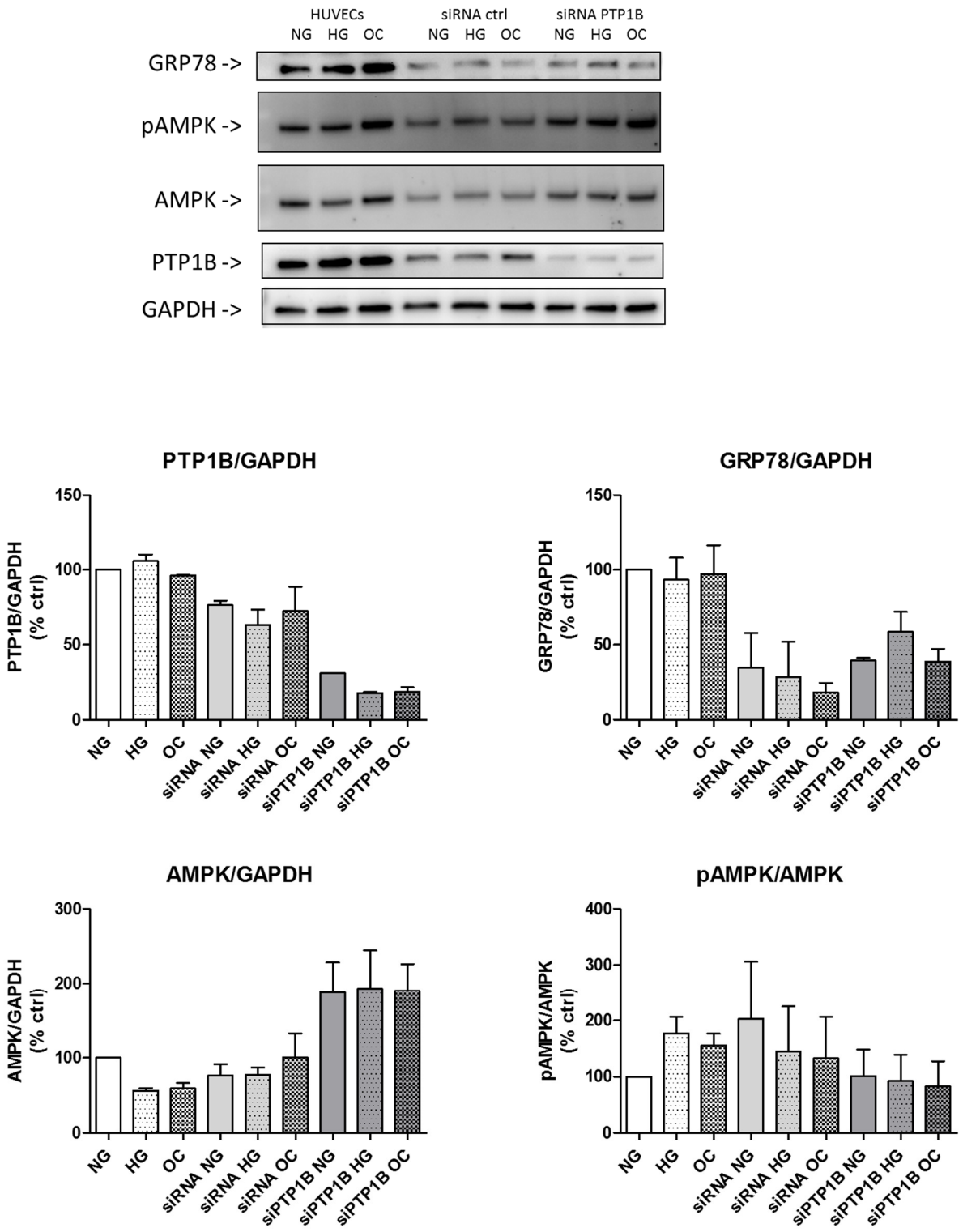


Figure 39 : La délétion de PTP1B chez les HUVECs est associée à une augmentation de l'expression de l'AMPK sans modification de son activité et ce, quelque soient les concentrations en glucose et/ou mannitol. NG : *normal glucose* (5 mM), HG : *high glucose* (25 mM), OC : *osmotic control* (5 mM glucose et 20 mM mannitol). n = 2 – 4.

CC BY NC ND

Afin d'étudier les interactions pouvant exister entre PTP1B et le stress du RE au niveau de l'endothélium, la relaxation d'aortes de souris PTP1B ECKO et WT a été évaluée après traitement des anneaux pendant 4h avec un inducteur chimique du stress du RE, la tunicamycine (5 µg/ml). Dans ces conditions expérimentales, la tunicamycine ne semble pas induire de changement de la relaxation dépendante et indépendante de l'endothélium (Figure 40, A et B). Cependant, les souris PTP1B ECKO présentent une diminution de l'EC_{50} du SNP par rapport aux souris WT ($3{,}47.10^{-9}$ M et $3{,}86.10^{-9}$ M contre $7{,}15.10^{-9}$ M et $8{,}31.10^{-9}$ M respectivement).

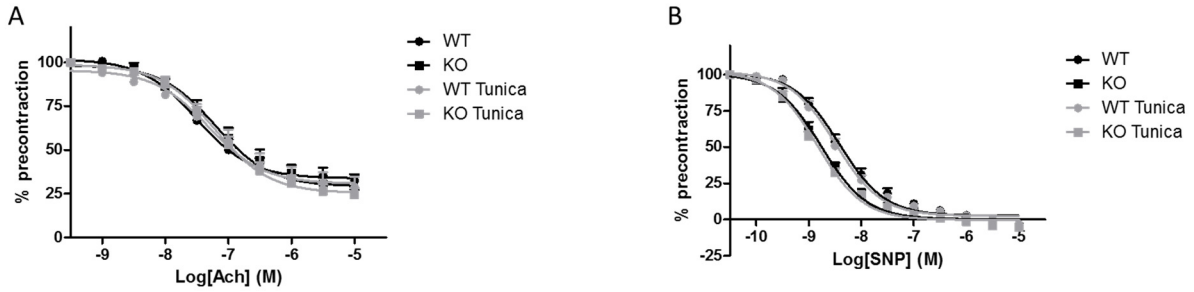


Figure 40 : Absence de dysfonction endothéliale induite par la tunicamycine mais diminution de l'EC_{50} du SNP chez les souris PTP1B ECKO par rapport aux souris WT. n = 8.

De plus, la tunicamycine semble augmenter l'expression de GRP78 dans les cellules endothéliales extraites à partie d'aortes de souris WT et PTP1B KO après 4 h de traitement (Figure 41, A). La délétion ne permettrait pas de prévenir le stress du RE induit par la tunicamycine. Cependant, elle réduirait considérablement l'expression basale de GRP78 (Figure 41, A).

De plus, le traitement par la tunicamycine semble diminuer l'expression de l'AMPK chez les cellules endothéliales extraites à partir d'aortes de souris PTP1B KO sans pour autant en modifier l'activité (Figure 41, B). De façon intéressante, la délétion totale de PTP1B dans ces cellules serait également associée à une augmentation de l'expression de l'AMPK, en accord avec les résultats obtenus précédemment sur HUVECs (Figure 41, B).

CC BY NC ND

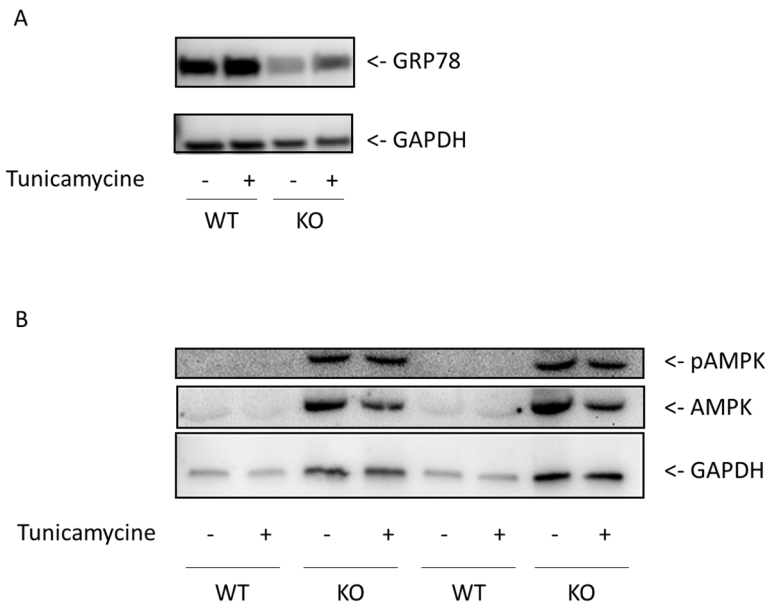


Figure 41 : Expression de GRP78 (A) et pAMPK et AMPK (B) chez des cellules endothéliales extraites à partir de souris WT et KO pour PTP1B et traitées pendant 4h avec de la tunicamycine.

cc BY NC ND

5 – Discussion, conclusion et perspectives

L'ensemble de ces travaux, encore préliminaires, semblent toutefois confirmer sur deux modèles différents de souris, Akita et C57Bl6 traitées avec STZ, que le DT1 induit une dysfonction endothéliale. De façon intéressante, la délétion de PTP1B spécifiquement au niveau endothélial préviendrait totalement cette dysfonction endothéliale induite par le DT1. De plus, l'exposition à une forte concentration en glucose, que ce soit *in vivo* sur souris atteinte de DT1 ou *in vitro* après traitement pendant 5 jours, induirait une augmentation de l'expression de GRP78, un marqueur du stress du RE sur cellule endothéliale. Enfin, la délétion ou la diminution de l'expression de PTP1B au niveau endothélial semble induire une diminution de l'expression basale de GRP78 ainsi qu'une augmentation de l'expression d'AMPK.

Les souris Akita comportent une mutation au niveau du gène codant pour l'insuline. Il en résulte alors une très faible production et libération d'insuline mature dans leur circulation générale[216]. Ces souris Akita sont donc un modèle pertinent pour l'étude du DT1 tout comme les souris C57Bl6 traitées avec STZ. Ces deux modèles murins du DT1 présentent une dysfonction endothéliale par rapport à leurs contrôles respectifs. Ces résultats confortent les résultats préliminaires obtenus notamment chez l'Homme mais nécessitent cependant d'être confirmés par un nombre d'expériences plus important.

L'avancée majeure de ces travaux provient des résultats chez les souris PTP1B ECKO traitées avec STZ. En effet, la délétion endothéliale de PTP1B, à elle seule, préviendrait la dysfonction endothéliale induite par le traitement STZ. La délétion totale de PTP1B chez la souris avait déjà été identifiée comme prévenant la dysfonction endothéliale induite par STZ[176]. Ces travaux non seulement vont dans le même sens mais semblent également préciser que PTP1B seulement dans les cellules endothéliales suffirait pour réguler cette dysfonction endothéliale. Ces observations permettent de confirmer PTP1B comme cible potentielle pour la prévention voire le traitement de la dysfonction endothéliale induite par le DT1. En ce sens, il serait intéressant de voir l'effet d'un inhibiteur de PTP1B sur la fonction endothéliale avec un modèle de DT1 tel que des souris traitées avec de la STZ par exemple. De plus, l'inhibition de la eNOS seule mais pas des COXs seuls semble abolir cet effet. En revanche, l'inhibition à la fois de la eNOS et des COXs suggèreraient l'implication d'un autre facteur vasodilatateur dérivé de l'endothélium tel que l'EDHF. Le NO ainsi que l'EDHF semblent donc être les médiateurs impliqués dans la prévention de la dysfonction endothéliale induite par le traitement au STZ chez les souris PTP1B ECKO. L'ensemble de ces résultats doit cependant être confirmé par des études supplémentaires.

CC BY NC ND

Si le traitement pendant 4 h par la tunicamycine ne semble pas induire de changement dans la relaxation à l'Ach chez les aortes de souris WT et PTP1B ECKO, les courbes de relaxation au SNP semblent quant à elles révéler une plus grande sensibilité des aortes de souris PTP1B ECKO par rapport aux aortes de souris WT. Ainsi, la délétion de PTP1B spécifiquement dans les cellules endothéliales augmenterait la sensibilité des cellules musculaires lisses au NO. Il avait déjà été montré que la délétion de PTP1B augmentait l'expression endothéliale de COX-2 et impliquait préférentiellement la voie de PGI2 dans la relaxation induite par l'Ach. Dans ce contexte, PGI2 prendrait donc une place prépondérante par rapport au NO pour la relaxation induite par l'Ach. Il est alors possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle les cellules musculaires lisses, suite à la délétion de PTP1B au niveau endothélial, seraient moins en contact avec le NO et pourraient ainsi accroître leur sensibilité à celui-ci. Cette hypothèse pourrait apporter une explication quant à la diminution de l'EC_{50} du SNP pour les aortes des souris PTP1B ECKO par rapport aux souris WT. Cela corrèlerait également avec les résultats de relaxation à l'Ach des aortes obtenus en présence de L-NAME chez les souris WT et PTP1B ECKO.

En revanche, il avait déjà été montré que des souris traitées par voie intra-péritonéale deux fois par semaine pendant deux semaines avec de la tunicamycine présentaient une dysfonction endothéliale[185]. Le fait de ne pas retrouver cette dysfonction endothéliale après un traitement des aortes de souris pendant 4h amène à penser qu'un traitement *in vivo* par la tunicamycine semble préférable à un traitement *ex vivo* pour induire une dysfonction endothéliale. Une autre hypothèse serait que le temps de traitement ne serait pas suffisant. En effet, dans cette dernière étude, après une cinétique de traitement, les auteurs ont conclu que 6h de traitement par la tunicamycine étaient suffisants mais nécessaires pour induire une augmentation de l'expression de marqueurs du stress du RE dans des cellules endothéliales de coronaires de souris[185].

Chez la souris mais également chez l'Homme, la dysfonction endothéliale induite par le DT1 est associée à une augmentation des marqueurs endothéliaux du stress du RE. Afin d'évaluer si PTP1B pouvait réguler le stress du RE, l'expression de GRP78, un marqueur du stress du RE, a été évaluée dans des cellules endothéliales provenant de souris PTP1B KO et sur HUVECs préalablement traitées avec siRNA PTP1B. La délétion ou la diminution de l'expression de PTP1B ne permettrait pas de prévenir l'augmentation de l'expression de GRP78 induite par la tunicamycine. En revanche, elle permettrait de diminuer le niveau basal d'expression de ce marqueur. Ces résultats confirmeraient alors le lien existant entre PTP1B et

cc BY NC ND

le stress du RE au niveau endothélial et apporteraient une fois de plus la preuve que PTP1B est une cible majeure pour la prévention de la dysfonction endothéliale dans le cadre du DT1.

De nombreux travaux ont identifié AMPK, un régulateur clé de l'homéostasie du métabolisme énergétique des cellules, comme présentant des effets vasculoprotecteurs[217,218]. La délétion de PTP1B chez la souris avait déjà été identifiée comme ayant un effet cardioprotecteur du régime riche en graisse par activation de l'AMPK[219]. De plus, l'activation d'AMPK est associée à une augmentation de la production du NO par les cellules endothéliales[220]. Néanmoins, aucune étude jusqu'à présent ne s'était intéressée à évaluer le lien entre PTP1B et AMPK au niveau endothélial. Les résultats de cette étude montrent dans deux modèles différents de cellule endothéliale que la diminution de l'expression ou la délétion de PTP1B entrainerait systématiquement une augmentation de l'expression d'AMPK. Comme le rapport pAMPK/AMPK ne semble pas différent et qu'il est associé à une augmentation de la protéine totale, il est possible d'en déduire également dans ces conditions une augmentation de la protéine activée sous forme phosphorylée. De plus, la tunicamycine semble diminuer l'expression d'AMPK dans les cellules endothéliales même en absence de PTP1B. La délétion de PTP1B permettrait donc à la fois de diminuer le niveau basal de stress du RE et d'augmenter l'expression d'AMPK. Cette délétion ne semble cependant pas suffisante pour prévenir la diminution de l'expression d'AMPK induite par activation chimique du stress du RE. Le rôle d'AMPK dans la prévention de la dysfonction endothéliale due à la délétion de PTP1B en conditions diabétiques doit désormais faire l'objet d'études supplémentaires afin de déterminer les liens existant entre PTP1B, le stress du RE et AMPK.

Une autre partie de ce travail consistait à vérifier si l'hyperglycémie était responsable de l'augmentation de l'expression de PTP1B et/ou du stress du RE. Une exposition des HAECs à une forte concentration de glucose pendant 5 jours est responsable d'une augmentation de l'expression de PTP1B[176]. Des HUVECs transfectées ou non avec un siRNA PTP1B ont alors été traitées dans les mêmes conditions expérimentales avec une forte concentration de glucose ou de mannitol, ce dernier afin d'évaluer l'effet de l'augmentation de la concentration osmotique. Etonnamment, aucune augmentation de l'expression de PTP1B ni de GRP78 ne semble apparaître dans ces conditions. Les HUVECs semblent donc se comporter différemment par rapport aux HAECs sous une forte concentration de glucose. Cette disparité pourrait venir du changement rapide de phénotype de ces cellules primaires en culture. De plus, les HAECs proviennent de patients particuliers dont les antécédents sont ignorés et pourraient influencer la réactivité métabolique dans des conditions de forte concentration en glucose.

cc BY NC ND

En conclusion, ces travaux permettent de mettre en lumière l'intérêt de la délétion ou de la diminution de l'expression de PTP1B dans la prévention de la dysfonction endothéliale induite par le DT1. Cet intérêt a également été montré récemment par différentes études mettant en évidence que la délétion spécifiquement endothéliale de PTP1B permettait de restaurer la dysfonction endothéliale induite par l'insuffisance cardiaque chronique ou qu'elle permettait d'augmenter les processus angiogéniques en régulant notamment la voie du VEGFR2[54,79,182]. Cependant, si l'association entre la dysfonction endothéliale induite par le DT1 et l'augmentation de PTP1B et des marqueurs du stress du RE semble désormais admise chez l'animal comme chez l'Homme, leur étiologie demeure encore aujourd'hui imprécise.

CC BY NC ND

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis d'étudier la physiopathologie de l'endothélium à travers deux aspects pouvant mener à des processus pathologiques : l'angiogenèse et la dysfonction endothéliale.

Dans la première partie, l'information importante, au-delà de la mise en évidence de l'effet pro-angiogénique du DEET, est que la présence simultanée d'un inhibiteur de l'AchE et d'un modulateur allostérique du récepteur M3 suffit à activer les mécanismes d'angiogenèse dans la cellule endothéliale. Si ces résultats méritent d'être retrouvés à nouveau avec d'autres molécules, ils confirment tout de même non seulement la présence mais également l'importance du rôle du SCNN dans les processus physiologiques et physiopathologiques. Ce SCNN pourrait alors constituer une cible innovante pour l'identification de nouveaux traitements anti-angiogéniques et ainsi augmenter le panel de thérapies anti-cancéreuses disponibles pour le traitement des tumeurs solides.

De plus, ces travaux montrent clairement un effet pro-angiogénique et une augmentation de la croissance tumorale suite à un traitement par le DEET *in vivo*, dans un organisme dont des cellules tumorales ont été injectées au préalable. Cependant, il n'existe aucune étude dans la littérature ayant évalué l'effet du DEET sur la fonction vasculaire et plus particulièrement sur l'endothélium d'un sujet sain ou atteint de pathologies cardiovasculaires. En effet, en accord avec les résultats de cette étude, l'augmentation de la production du NO suite à une stimulation de l'endothélium par le DEET pourrait avoir des effets bénéfiques sur la fonction endothéliale et par conséquent sur la fonction vasculaire. De même, l'effet pro-angiogénique du DEET pourrait être exploité dans les pathologies ischémiques, qu'elles soient cardiaques comme l'infarctus ou la coronaropathie ou au niveau des membres inférieurs dans le cas du diabète par exemple. Ces travaux ouvrent donc des perspectives non négligeables quant à l'utilisation dans le domaine cardiovasculaire de modulateurs allostériques de M3 et/ou d'inhibiteurs de l'AchE voire même du DEET lui-même.

Dans la deuxième étude, l'avancée majeure est que la délétion spécifiquement endothéliale de PTP1B permet de prévenir la dysfonction endothéliale induite par le DT1 et de réduire le niveau basal du stress du RE. Néanmoins, il demeure encore difficile de conclure quant à la responsabilité de l'hyperglycémie dans l'augmentation vasculaire de PTP1B et l'induction du stress du RE. En effet, la taille des échantillons doit être augmentée afin de

CC BY NC ND

confirmer ces premiers résultats. De plus, une nouvelle méthode *in vitro* permettant d'évaluer l'effet d'une forte concentration du glucose sur les cellules endothéliales devra être mise au point. Les cellules endothéliale de type EaHy pourront par exemple être utilisées afin de s'affranchir des modifications de phénotype retrouvées avec les cellules primaires. Cette méthode permettra alors d'étudier précisément l'expression de PTP1B et des marqueurs du stress du RE ainsi que la phosphorylation de la eNOS et la production du NO dans des cellules endothéliales traitées avec une forte concentration de glucose et préalablement traitées ou non avec un siRNA PTP1B. Dans le même ordre d'idée, l'isolation des cellules endothéliales à partir de souris PTP1B ECKO et WT préalablement traitées ou non avec STZ permettrait également d'évaluer les expressions des différents marqueurs du stress du RE.

Ainsi, les rôles et les implications de PTP1B et du stress du RE dans les régulations de la fonction endothéliale dans le cadre du DT1 pourraient être définis plus précisément. Ceci permettrait de confirmer l'importance de l'utilisation et du développement d'inhibiteurs de PTP1B et du stress du RE en préclinique. En effet, des molécules comme MSI-1436 (trodusquemine) ou l'oligonucléotide anti sens ISIS-113,715 ont été identifiés respectivement comme un inhibiteur ou un réducteur de l'expression de PTP1B et ont montré un intérêt dans le traitement et/ou la prévention de pathologies métaboliques et cardiovasculaires[221]. Cependant, malgré un effet indéniable sur les pathologies métaboliques, certains effets secondaires peuvent apparaître avec ces traitements, du fait notamment de l'expression ubiquitaire de PTP1B. L'inhibition ou la délétion de PTP1B a d'ailleurs été récemment identifiée comme pouvant exacerber la pancréatite induite chez la souris[222]. Un problème subsiste donc dans le ciblage de PTP1B de façon tissu-spécifique. L'utilisation de nanoparticules permettant de cibler la délivrance d'un principe actif uniquement au niveau de l'endothélium a déjà été mise au point, démontrant ainsi la faisabilité de la vectorisation pour l'endothélium[223]. La mise au point de vecteurs permettant de cibler spécifiquement l'endothélium et par conséquent de délivrer un principe actif à cet organe plutôt qu'aux autres constitue donc un nouveau challenge pour le traitement des pathologies de l'endothélium et plus largement des pathologies cardiovasculaires[224].

Enfin, de manière générale, ces travaux mettent en évidence l'importance de la plasticité des cellules endothéliales ainsi que leurs rôles dans divers mécanismes physiopathologiques de maladies cardiovasculaires comme tumorales. L'endothélium, bien qu'il soit l'objet de nombreuses études depuis plusieurs décennies, reste un organe clé pour l'identification de

CC BY NC ND

marqueurs précoces ainsi que pour l'étude de la physiologie et de la physiopathologie de nombreuses maladies.

CC BY NC ND

BY NC ND

REFERENCES

1. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288,** 373–376 (1980).
2. Palmer, R. M., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327,** 524–526 (1987).
3. Griffith, T. M., Edwards, D. H., Lewis, M. J., Newby, A. C. & Henderson, A. H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature* **308,** 645–647 (1984).
4. Chen, G., Suzuki, H. & Weston, A. H. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br. J. Pharmacol.* **95,** 1165–1174 (1988).
5. de Deckere, E. A., Nugteren, D. H. & Ten Hoor, F. Prostacyclin is the major prostaglandin released from the isolated perfused rabbit and rat heart. *Nature* **268,** 160–163 (1977).
6. Yanagisawa, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332,** 411–415 (1988).
7. Hamberg, M., Svensson, J. & Samuelsson, B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72,** 2994–2998 (1975).
8. Félétou, M. *Introduction*. (Morgan & Claypool Life Sciences, 2011).
9. Atkins, G. B., Jain, M. K. & Hamik, A. Endothelial Differentiation Molecular Mechanisms of Specification and Heterogeneity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31,** 1476–1484 (2011).
10. Marcelo, K. L., Goldie, L. C. & Hirschi, K. K. Regulation of Endothelial Cell Differentiation and Specification. *Circ. Res.* **112,** 1272–1287 (2013).
11. Sumpio, B. E., Riley, J. T. & Dardik, A. Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34,** 1508–1512 (2002).

CC BY NC ND

12. Marieb, E. N., Hoehn, K., Moussakova, L. & Lachaîne, R. *Anatomie et physiologie humaines : Adaptation de la 9e édition américaine, Le manuel + la plateforme numérique MonLab*. (Pearson Education, 2014).

13. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* **100,** 158–173 (2007).

14. Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* **100,** 174–190 (2007).

15. Krebs, L. T. *et al.* Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev.* **14,** 1343–1352 (2000).

16. Mukouyama, Y.-S., Gerber, H.-P., Ferrara, N., Gu, C. & Anderson, D. J. Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Dev. Camb. Engl.* **132,** 941–952 (2005).

17. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473,** 298–307 (2011).

18. Wakefield, T. W. *et al.* Venous thrombosis prophylaxis by inflammatory inhibition without anticoagulation therapy. *J. Vasc. Surg.* **31,** 309–324 (2000).

19. Schmid-Schönbein, G. W., Takase, S. & Bergan, J. J. New Advances in the Understanding of the Pathophysiology of Chronic Venous Insufficiency. *Angiology* **52,** S27–S34 (2001).

20. Eriksson, E. E. *et al.* Powerful inflammatory properties of large vein endothelium in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25,** 723–728 (2005).

21. Kwei, S. *et al.* Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *Am. J. Pathol.* **164,** 81–89 (2004).

22. Golledge, J., Turner, R. J., Harley, S. L., Springall, D. R. & Powell, J. T. Circumferential deformation and shear stress induce differential responses in saphenous vein endothelium exposed to arterial flow. *J. Clin. Invest.* **99,** 2719–2726 (1997).

CC BY NC ND

23. Hida, K., Maishi, N., Sakurai, Y., Hida, Y. & Harashima, H. Heterogeneity of tumor endothelial cells and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **99,** 140–147 (2016).

24. Hida, K., Maishi, N., Torii, C. & Hida, Y. Tumor angiogenesis-characteristics of tumor endothelial cells. *Int. J. Clin. Oncol.* **21,** 206–212 (2016).

25. Roche, C. *et al.* Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese insulin-resistant mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **308,** H1020-1029 (2015).

26. Giles, T. D., Sander, G. E., Nossaman, B. D. & Kadowitz, P. J. Impaired vasodilation in the pathogenesis of hypertension: focus on nitric oxide, endothelial-derived hyperpolarizing factors, and prostaglandins. *J. Clin. Hypertens. Greenwich Conn* **14,** 198–205 (2012).

27. Bellien, J., Joannides, R., Richard, V. & Thuillez, C. Modulation of cytochrome-derived epoxyeicosatrienoic acids pathway: a promising pharmacological approach to prevent endothelial dysfunction in cardiovascular diseases? *Pharmacol. Ther.* **131,** 1–17 (2011).

28. Bellien, J. & Joannides, R. Epoxyeicosatrienoic acid pathway in human health and diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **61,** 188–196 (2013).

29. Fleming, I., Bauersachs, J., Fisslthaler, B. & Busse, R. Ca2+-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ. Res.* **82,** 686–695 (1998).

30. Ayajiki, K., Kindermann, M., Hecker, M., Fleming, I. & Busse, R. Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells. *Circ. Res.* **78,** 750–758 (1996).

31. Muller, J. M., Davis, M. J. & Chilian, W. M. Coronary arteriolar flow-induced vasodilation signals through tyrosine kinase. *Am. J. Physiol.* **270,** H1878-1884 (1996).

32. McCabe, T. J., Fulton, D., Roman, L. J. & Sessa, W. C. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain 'calcium-independent' eNOS activation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **275,** 6123–6128 (2000).

33. Goyal, R. K. Muscarinic receptor subtypes. Physiology and clinical implications. *N. Engl. J. Med.* **321,** 1022–1029 (1989).

34. Barton, M. & Yanagisawa, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86,** 485–498 (2008).

35. Lüscher, T. F. & Barton, M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* **102,** 2434–2440 (2000).

36. Maguire, J. J. & Davenport, A. P. Endothelin Receptors and Their Antagonists. *Semin. Nephrol.* **35,** 125–136 (2015).

37. Vanhoutte, P. M. Endothelium-Dependent Contractions in Hypertension When Prostacyclin Becomes Ugly. *Hypertension* **57,** 526–531 (2011).

38. Matsumoto, T., Goulopoulou, S., Taguchi, K., Tostes, R. C. & Kobayashi, T. Constrictor prostanoids and uridine adenosine tetraphosphate: vascular mediators and therapeutic targets in hypertension and diabetes. *Br. J. Pharmacol.* **172,** 3980–4001 (2015).

39. Wong, M. S.-K. & Vanhoutte, P. M. COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries. *Acta Pharmacol. Sin.* **31,** 1095–1102 (2010).

40. Jankowski, V. *et al.* Uridine adenosine tetraphosphate: a novel endothelium- derived vasoconstrictive factor. *Nat. Med.* **11,** 223–227 (2005).

41. Katusic, Z. S. & Vanhoutte, P. M. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am. J. Physiol.* **257,** H33-37 (1989).

42. Rubanyi, G. M. & Vanhoutte, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol.* **250,** H822-827 (1986).

43. Miller, V. M. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclooxygenase. *Am. J. Physiol.* **248,** H432-437 (1985).

44. Yang, D. *et al.* Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **136,** 104–110 (2002).

BY NC ND

45. Panza, J. A., Quyyumi, A. A., Brush, J. E. & Epstein, S. E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* **323,** 22–27 (1990).

46. Vita, J. A. *et al.* Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* **81,** 491–497 (1990).

47. Verma, S., Buchanan, M. R. & Anderson, T. J. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation* **108,** 2054–2059 (2003).

48. Calver, A., Collier, J. & Vallance, P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* **90,** 2548–2554 (1992).

49. Celermajer, D. S. *et al.* Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* **88,** 2149–2155 (1993).

50. Gonzalez, M. A. & Selwyn, A. P. Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am. J. Med.* **115 Suppl 8A,** 99S–106S (2003).

51. Pauriah, M. *et al.* B-type natriuretic peptide is an independent predictor of endothelial function in man. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **123,** 307–312 (2012).

52. Mordi, I., Mordi, N., Delles, C. & Tzemos, N. Endothelial dysfunction in human essential hypertension. *J. Hypertens.* (2016). doi:10.1097/HJH.0000000000000965

53. Bernatova, I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *BioMed Res. Int.* **2014,** 598271 (2014).

54. Maupoint, J. *et al.* Selective Vascular Endothelial Protection Reduces Cardiac Dysfunction in Chronic Heart Failure. *Circ. Heart Fail.* **9,** e002895 (2016).

55. Udan, R. S., Culver, J. C. & Dickinson, M. E. Understanding vascular development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2,** 327–346 (2013).

56. Vandekeere, S., Dewerchin, M. & Carmeliet, P. Angiogenesis Revisited: An Overlooked Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. *Microcirc. N. Y. N 1994* **22,** 509–517 (2015).

57. Gao, N. *et al.* Arsenite induces HIF-1alpha and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* **255,** 33–45 (2004).

58. Kao, Y.-H., Yu, C.-L., Chang, L. W. & Yu, H.-S. Low concentrations of arsenic induce vascular endothelial growth factor and nitric oxide release and stimulate angiogenesis in vitro. *Chem. Res. Toxicol.* **16,** 460–468 (2003).

59. Liu, F. *et al.* Low-Dose Cadmium Upregulates VEGF Expression in Lung Adenocarcinoma Cells. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **12,** 10508–10521 (2015).

60. Andersson, H. & Brittebo, E. Proangiogenic effects of environmentally relevant levels of bisphenol A in human primary endothelial cells. *Arch. Toxicol.* **86,** 465–474 (2012).

61. Clere, N., Lauret, E., Malthiery, Y., Andriantsitohaina, R. & Faure, S. Estrogen receptor alpha as a key target of organochlorines to promote angiogenesis. *Angiogenesis* **15,** 745–760 (2012).

62. Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146,** 873–887 (2011).

63. Laurenzana, A. *et al.* Endothelial Progenitor Cells in Sprouting Angiogenesis: Proteases Pave the Way. *Curr. Mol. Med.* **15,** 606–620 (2015).

64. Fischer, C., Schneider, M. & Carmeliet, P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 157–212 (2006).

65. Bazzoni, G. & Dejana, E. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiol. Rev.* **84,** 869–901 (2004).

66. Oldenburg, J. & Rooij, J. de. Mechanical control of the endothelial barrier. *Cell Tissue Res.* **355,** 545–555 (2014).

67. Coffelt, S. B. *et al.* Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. *Am. J. Pathol.* **176,** 1564–1576 (2010).

68. van Hinsbergh, V. W. M. & Koolwijk, P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc. Res.* **78,** 203–212 (2008).

69. Stapor, P., Wang, X., Goveia, J., Moens, S. & Carmeliet, P. Angiogenesis revisited – role and therapeutic potential of targeting endothelial metabolism. *J Cell Sci* **127,** 4331–4341 (2014).

70. Eelen, G., Cruys, B., Welti, J., De Bock, K. & Carmeliet, P. Control of vessel sprouting by genetic and metabolic determinants. *Trends Endocrinol. Metab.* **24,** 589–596 (2013).

71. De Bock, K., Georgiadou, M. & Carmeliet, P. Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting. *Cell Metab.* **18,** 634–647 (2013).

72. Priya, M. K. *et al.* Tipping off endothelial tubes: nitric oxide drives tip cells. *Angiogenesis* **18,** 175–189 (2015).

73. Chambers, S. E. J., O'Neill, C. L., O'Doherty, T. M., Medina, R. J. & Stitt, A. W. The role of immune-related myeloid cells in angiogenesis. *Immunobiology* **218,** 1370–1375 (2013).

74. Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B. & Lewis, C. E. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **8,** 618–631 (2008).

75. Slevin, M. & Krupinski, J. A role for monomeric C-reactive protein in regulation of angiogenesis, endothelial cell inflammation and thrombus formation in cardiovascular/cerebrovascular disease? *Histol. Histopathol.* **24,** 1473–1478 (2009).

76. Pujadas, G. & Drucker, D. J. Vascular biology of glucagon receptor superfamily peptides: complexity, controversy, and clinical relevance. *Endocr. Rev.* er20161078 (2016). doi:10.1210/er.2016-1078

77. Welten, S. M. J., Goossens, E. a. C., Quax, P. H. A. & Nossent, A. Y. The multifactorial nature of microRNAs in vascular remodelling. *Cardiovasc. Res.* **110,** 6–22 (2016).

78. Tomasetti, M., Amati, M., Santarelli, L. & Neuzil, J. MicroRNA in Metabolic Re-Programming and Their Role in Tumorigenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **17,** (2016).

79. Lanahan, A. A. *et al.* PTP1b is a physiologic regulator of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circulation* **130,** 902–909 (2014).

80. Besnier, M. *et al.* Enhanced angiogenesis and increased cardiac perfusion after myocardial infarction in protein tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28,** 3351–3361 (2014).

81. Weeks, J. A., Guiney, P. D. & Nikiforov, A. I. Assessment of the environmental fate and ecotoxicity of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Integr. Environ. Assess. Manag.* **8,** 120–134 (2012).

82. Santhanam, A., Miller, M. A. & Kasting, G. B. Absorption and evaporation of N,N-diethyl-m-toluamide from human skin in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204,** 81–90 (2005).

83. Debboun, M., Strickman, D. A. & Klun, J. A. Repellents and the military: our first line of defense. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **21,** 4–6 (2005).

84. Kitchen, L. W., Lawrence, K. L. & Coleman, R. E. The role of the United States military in the development of vector control products, including insect repellents, insecticides, and bed nets. *J. Vector Ecol. J. Soc. Vector Ecol.* **34,** 50–61 (2009).

85. DeGennaro, M. The mysterious multi-modal repellency of DEET. *Fly (Austin)* **9,** 45–51 (2015).

86. *Personal Protective Measures Against Insects and Other Arthropods of*. (Lulu.com, 2011).

87. Aronson, D., Weeks, J., Meylan, B., Guiney, P. D. & Howard, P. H. Environmental release, environmental concentrations, and ecological risk of N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET). *Integr. Environ. Assess. Manag.* **8,** 135–166 (2012).

88. Alpern, J. D., Dunlop, S. J., Dolan, B. J., Stauffer, W. M. & Boulware, D. R. Personal Protection Measures Against Mosquitoes, Ticks, and Other Arthropods. *Med. Clin. North Am.* **100,** 303–316 (2016).

89. Diaz, J. H. Chemical and Plant-Based Insect Repellents: Efficacy, Safety, and Toxicity. *Wilderness Environ. Med.* **27,** 153–163 (2016).

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

91. Ditzen, M., Pellegrino, M. & Vosshall, L. B. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science* **319,** 1838–1842 (2008).

cc BY NC ND

92. Bohbot, J. D. & Dickens, J. C. Odorant receptor modulation: ternary paradigm for mode of action of insect repellents. *Neuropharmacology* **62,** 2086–2095 (2012).

93. Pellegrino, M., Steinbach, N., Stensmyr, M. C., Hansson, B. S. & Vosshall, L. B. A natural polymorphism alters odour and DEET sensitivity in an insect odorant receptor. *Nature* **478,** 511–514 (2011).

94. Xu, P., Choo, Y.-M., De La Rosa, A. & Leal, W. S. Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111,** 16592–16597 (2014).

95. Leal, W. S. The enigmatic reception of DEET — the gold standard of insect repellents. *Curr. Opin. Insect Sci.* **6,** 93–98 (2014).

96. Davis, E. E. A receptor sensitive to oviposition site attractants on the antennae of the mosquito, Aedes Aegypti. *J. Insect Physiol.* **22,** 1371–1376 (1976).

97. Lee, Y., Kim, S. H. & Montell, C. Avoiding DEET through Insect Gustatory Receptors. *Neuron* **67,** 555–561 (2010).

98. Corbel, V. *et al.* Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biol.* **7,** 47 (2009).

99. Abd-Ella, A. *et al.* The Repellent DEET Potentiates Carbamate Effects via Insect Muscarinic Receptor Interactions: An Alternative Strategy to Control Insect Vector-Borne Diseases. *PLOS ONE* **10,** e0126406 (2015).

100. Kain, P. *et al.* Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents. *Nature* **502,** 507–512 (2013).

101. Taylor, W. G., Danielson, T. J., Spooner, R. W. & Golsteyn, L. R. Pharmacokinetic assessment of the dermal absorption of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) in cattle. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **22,** 106–112 (1994).

102. Blume, R. R., Roberts, R. H., Eschle, J. L. & Matter, J. J. Tests of aerosols of deet for protection of livestock from biting flies. *J. Econ. Entomol.* **64,** 1193–1196 (1971).

103. Ríha, J., Minár, J., Lamatová, Z. & Matousková, O. [Economic significance of the prevention of losses caused by blood-sucking diptera in grazing dairy cows]. *Veterinární Medicína* **24,** 275–283 (1979).

104. Herholz, C. *et al.* Efficacy of the repellent N,N-diethyl-3-methyl-benzamide (DEET) against tabanid flies on horses evaluated in a field test in Switzerland. *Vet. Parasitol.* **221,** 64–67 (2016).

105. Costanzo, S. D., Watkinson, A. J., Murby, E. J., Kolpin, D. W. & Sandstrom, M. W. Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments? *Sci. Total Environ.* **384,** 214–220 (2007).

106. Osimitz, T. G. & Murphy, J. V. Neurological effects associated with use of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **35,** 435–441 (1997).

107. Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E. & Hart, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci. Total Environ.* **416,** 1–21 (2012).

108. Loos, R. *et al.* EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res.* **47,** 6475–6487 (2013).

109. Sun, J., Luo, Q., Wang, D. & Wang, Z. Occurrences of pharmaceuticals in drinking water sources of major river watersheds, China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **117,** 132–140 (2015).

110. Barnes, K. K. *et al.* A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States--I) groundwater. *Sci. Total Environ.* **402,** 192–200 (2008).

111. Focazio, M. J. *et al.* A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States--II) untreated drinking water sources. *Sci. Total Environ.* **402,** 201–216 (2008).

112. French, V. A. *et al.* Characterisation of microcontaminants in Darwin Harbour, a tropical estuary of northern Australia undergoing rapid development. *Sci. Total Environ.* **536,** 639–647 (2015).

CC BY NC ND

113. Reeder, N. L., Ganz, P. J., Carlson, J. R. & Saunders, C. W. Isolation of a deet-insensitive mutant of Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae). *J. Econ. Entomol.* **94,** 1584–1588 (2001).

114. Stanczyk, N. M., Brookfield, J. F. Y., Ignell, R., Logan, J. G. & Field, L. M. Behavioral insensitivity to DEET in Aedes aegypti is a genetically determined trait residing in changes in sensillum function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 8575–8580 (2010).

115. Stanczyk, N. M., Brookfield, J. F. Y., Field, L. M. & Logan, J. G. Aedes aegypti mosquitoes exhibit decreased repellency by DEET following previous exposure. *PloS One* **8,** e54438 (2013).

116. Selim, S., Hartnagel, R. E., Osimitz, T. G., Gabriel, K. L. & Schoenig, G. P. Absorption, metabolism, and excretion of N,N-diethyl-m-toluamide following dermal application to human volunteers. *Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.* **25,** 95–100 (1995).

117. Smallwood, A. W., DeBord, K. E. & Lowry, L. K. N,N'-diethyl-m-toluamide (m-DET): analysis of an insect repellent in human urine and serum by high-performance liquid chromatography. *J. Anal. Toxicol.* **16,** 10–13 (1992).

118. Fediuk, D. J. *et al.* Tissue disposition of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone following intravenous and topical administration in rats. *Biopharm. Drug Dispos.* **32,** 369–379 (2011).

119. Stinecipher, J. & Shah, J. Percutaneous permeation of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) from commercial mosquito repellents and the effect of solvent. *J. Toxicol. Environ. Health* **52,** 119–135 (1997).

120. Gu, X., Kasichayanula, S., Fediuk, D. J. & Burczynski, F. J. In-vitro permeation of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) and the sunscreen oxybenzone. *J. Pharm. Pharmacol.* **56,** 621–628 (2004).

121. Gu, X., Wang, T., Collins, D. M., Kasichayanula, S. & Burczynski, F. J. In vitro evaluation of concurrent use of commercially available insect repellent and sunscreen preparations. *Br. J. Dermatol.* **152,** 1263–1267 (2005).

122. Kasichayanula, S., House, J. D., Wang, T. & Gu, X. Percutaneous characterization of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone from topical skin application. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **223,** 187–194 (2007).

123. Kasting, G. B., Bhatt, V. D. & Speaker, T. J. Microencapsulation decreases the skin absorption of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **22,** 548–552 (2008).

124. Puglia, C., Bonina, F., Castelli, F., Micieli, D. & Sarpietro, M. G. Evaluation of percutaneous absorption of the repellent diethyltoluamide and the sunscreen ethylhexyl p-methoxycinnamate-loaded solid lipid nanoparticles: an in-vitro study. *J. Pharm. Pharmacol.* **61,** 1013–1019 (2009).

125. Karr, J. I., Speaker, T. J. & Kasting, G. B. A novel encapsulation of N,N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) favorably modifies skin absorption while maintaining effective evaporation rates. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **160,** 502–508 (2012).

126. Barr, D. B. *et al.* Pesticide concentrations in maternal and umbilical cord sera and their relation to birth outcomes in a population of pregnant women and newborns in New Jersey. *Sci. Total Environ.* **408,** 790–795 (2010).

127. Tian, J.-N. & Yiin, L.-M. Urinary metabolites of DEET after dermal application on child and adult subjects. *J. Environ. Health* **76,** 162–169 (2014).

128. Usmani, K. A. *et al.* In vitro human metabolism and interactions of repellent N,N-diethyl-m-toluamide. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **30,** 289–294 (2002).

129. Qiu, H., Jun, H. W. & Tao, J. Pharmacokinetics of insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide in beagle dogs following intravenous and topical routes of administration. *J. Pharm. Sci.* **86,** 514–516 (1997).

130. Bell, J. W., Veltri, J. C. & Page, B. C. Human Exposures to N,N-diethyl-m-toluamide insect repellents reported to the American Association of Poison Control Centers 1993-1997. *Int. J. Toxicol.* **21,** 341–352 (2002).

131. Charlton, N. P., Murphy, L. T., Parker Cote, J. L. & Vakkalanka, J. P. The toxicity of picaridin containing insect repellent reported to the National Poison Data System. *Clin. Toxicol. Phila. Pa* 1–4 (2016). doi:10.1080/15563650.2016.1186806

132. Wiles, D. *et al.* A lethal case of DEET toxicity due to intentional ingestion. *J. Anal. Toxicol.* **38,** 696–698 (2014).

133. Osimitz, T. G., Murphy, J. V., Fell, L. A. & Page, B. Adverse events associated with the use of insect repellents containing N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* **56,** 93–99 (2010).

134. Galassi, N., Romero, D. S. F., Yeyati, E. & Malbrán, A. Diethyltoluamide (DEET) increases CD63 expression in a contact urticaria patient's basophils. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* **39,** 55–57 (2011).

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

136. Leach, G. J., Russell, R. D. & Houpt, J. T. Some cardiovascular effects of the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *J. Toxicol. Environ. Health* **25,** 217–225 (1988).

137. Clem, J. R., Havemann, D. F. & Raebel, M. A. Insect repellent (N,N-diethyl-m-toluamide) cardiovascular toxicity in an adult. *Ann. Pharmacother.* **27,** 289–293 (1993).

138. Hardell, L., Näsman, A., Ohlson, C. G. & Fredrikson, M. Case-control study on risk factors for testicular cancer. *Int. J. Oncol.* **13,** 1299–1303 (1998).

139. McDuffie, H. H. *et al.* Insect repellents, phenoxyherbicide exposure, and non-Hodgkin's lymphoma. *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* **47,** 806–816 (2005).

140. Schoenig, G. P. *et al.* Evaluation of the chronic toxicity and oncogenicity of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **47,** 99–109 (1999).

141. Kakinuma, Y. *et al.* Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48,** 680–693 (2010).

BY NC ND

142. Mortazavian, S. M. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitors Promote Angiogenesis in Chick Chorioallantoic Membrane and Inhibit Apoptosis of Endothelial Cells, Acetylcholinesterase Inhibitors Promote Angiogenesis in Chick Chorioallantoic Membrane and Inhibit Apoptosis of Endothelial Cells. *Int. J. Alzheimer's Dis. Int. J. Alzheimer's Dis.* **2013, 2013,** e121068 (2013).

143. Carvalho, F. A., Graça, L. M., Martins-Silva, J. & Saldanha, C. Biochemical characterization of human umbilical vein endothelial cell membrane bound acetylcholinesterase. *FEBS J.* **272,** 5584–5594 (2005).

144. Grando, S. A., Kist, D. A., Qi, M. & Dahl, M. V. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *J. Invest. Dermatol.* **101,** 32–36 (1993).

145. Beckmann, J. & Lips, K. S. The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology* **92,** 286–302 (2013).

146. Wessler, I. K. & Kirkpatrick, C. J. in *Muscarinic Receptors* (eds. Fryer, A. D., Christopoulos, A. & Nathanson, N. M.) 469–491 (Springer Berlin Heidelberg, 2012). doi:10.1007/978-3-642-23274-9_20

147. Kirkpatrick, C. J. *et al.* The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn. J. Pharmacol.* **85,** 24–28 (2001).

148. Paleari, L., Grozio, A., Cesario, A. & Russo, P. The cholinergic system and cancer. *Semin. Cancer Biol.* **18,** 211–217 (2008).

149. Español, A. J., de la Torre, E., Fiszman, G. L. & Sales, M. E. Role of non-neuronal cholinergic system in breast cancer progression. *Life Sci.* **80,** 2281–2285 (2007).

150. Lee, J. & Cooke, J. P. Nicotine and pathological angiogenesis. *Life Sci.* **91,** 1058–1064 (2012).

151. Alessandrini, F. *et al.* The activation of M2 muscarinic receptor inhibits cell growth and survival in human glioblastoma cancer stem cells. *Int. Immunopharmacol.* **29,** 105–109 (2015).

152. Association, A. D. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **32,** S62–S67 (2009).

cc BY NC ND

153. Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M. & Mayer-Davis, E. J. Chapter 1: Epidemiology of Type 1 Diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **39,** 481–497 (2010).

154. Ounissi-Benkalha, H. & Polychronakos, C. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends Mol. Med.* **14,** 268–275 (2008).

155. Mehers, K. L. & Gillespie, K. M. The genetic basis for type 1 diabetes. *Br. Med. Bull.* **88,** 115–129 (2008).

156. Fourlanos, S. *et al.* The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. *Diabetes Care* **31,** 1546–1549 (2008).

157. Zaccone, P. & Hall, S. W. Helminth Infection and Type 1 Diabetes. *Rev. Diabet. Stud. RDS* **9,** 272–286 (2012).

158. Strachan, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **299,** 1259–1260 (1989).

159. Rook, G. A. W. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **42,** 5–15 (2012).

160. Bednar, K. J. & Ridgway, W. M. Targeting innate immunity for treatment of Type 1 diabetes. *Immunotherapy* **6,** 1239–1242 (2014).

161. Egro, F. M. Why is type 1 diabetes increasing? *J. Mol. Endocrinol.* **51,** R1–R13 (2013).

162. Kondrashova, A. & Hyöty, H. Role of viruses and other microbes in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int. Rev. Immunol.* **33,** 284–295 (2014).

163. Evolution des chiffres du diabète en France : les dernières études montrent une épidémie en forte hausse. *Diabète - Association Française des Diabétiques - AFD* Available at: http://www.afd.asso.fr/diabete/chiffres-france. (Accessed: 18th June 2016)

164. Tobalem, M. & Uçkay, I. Images in clinical medicine. Evolution of a diabetic foot infection. *N. Engl. J. Med.* **369,** 2252 (2013).

165. de Zeeuw, P., Wong, B. W. & Carmeliet, P. Metabolic adaptations in diabetic endothelial cells. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* **79,** 934–941 (2015).

166. Schalkwijk, C. G. & Stehouwer, C. D. A. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin. Sci.* **109,** 143–159 (2005).

167. Du, X. L. *et al.* Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97,** 12222–12226 (2000).

168. Chen, S., Apostolova, M. D., Cherian, M. G. & Chakrabarti, S. Interaction of endothelin-1 with vasoactive factors in mediating glucose-induced increased permeability in endothelial cells. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **80,** 1311–1321 (2000).

169. Idris, I., Gray, S. & Donnelly, R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* **44,** 659–673

170. Ladeia, A. M., Sampaio, R. R., Hita, M. C. & Adan, L. F. Prognostic value of endothelial dysfunction in type 1 diabetes mellitus. *World J. Diabetes* **5,** 601–605 (2014).

171. Bertoluci, M. C. *et al.* Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *World J. Diabetes* **6,** 679–692 (2015).

172. Reddy, M. A. & Natarajan, R. Targeting miR-200c to Ameliorate Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction. *Diabetes* **65,** 1152–1154 (2016).

173. Bhatwadekar, A. D. *et al.* miR-92a Corrects CD34+ Cell Dysfunction in Diabetes by Modulating Core Circadian Genes Involved in Progenitor Differentiation. *Diabetes* **64,** 4226–4237 (2015).

174. Lu, Z., Zhang, X., Li, Y., Jin, J. & Huang, Y. TLR4 antagonist reduces early-stage atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *J. Endocrinol.* **216,** 61–71 (2013).

175. Pahwa, R., Nallasamy, P. & Jialal, I. Toll-like receptors 2 and 4 mediate hyperglycemia induced macrovascular aortic endothelial cell inflammation and perturbation of the endothelial glycocalyx. *J. Diabetes Complications* **30,** 563–572 (2016).

176. Herren, D. J. *et al.* Deletion of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Enhances Endothelial Cyclooxygenase 2 Expression and Protects Mice from Type 1 Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction. *PloS One* **10,** e0126866 (2015).

cc BY NC ND

177. Elchebly, M. *et al.* Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283,** 1544–1548 (1999).

178. *Protein Tyrosine Phosphatase Control of Metabolism*. (Springer New York, 2013).

179. Hsu, M.-F. & Meng, T.-C. Enhancement of insulin responsiveness by nitric oxide-mediated inactivation of protein-tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.* **285,** 7919–7928 (2010).

180. Vercauteren, M. *et al.* Improvement of peripheral endothelial dysfunction by protein tyrosine phosphatase inhibitors in heart failure. *Circulation* **114,** 2498–2507 (2006).

181. Gomez, E. *et al.* Reduction of heart failure by pharmacological inhibition or gene deletion of protein tyrosine phosphatase 1B. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52,** 1257–1264 (2012).

182. Gogiraju, R. *et al.* Endothelial deletion of protein tyrosine phosphatase-1B protects against pressure overload-induced heart failure in mice. *Cardiovasc. Res.* **111,** 204–216 (2016).

183. Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8,** 519–529 (2007).

184. Zhang, K. & Kaufman, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* **454,** 455–462 (2008).

185. Galán, M. *et al.* Mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial dysfunction. *Biochim. Biophys. Acta* **1843,** 1063–1075 (2014).

186. Kassan, M. *et al.* Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32,** 1652–1661 (2012).

187. Ozcan, U. *et al.* Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* **313,** 1137–1140 (2006).

188. Amin, A. *et al.* Chronic inhibition of endoplasmic reticulum stress and inflammation prevents ischaemia-induced vascular pathology in type II diabetic mice. *J. Pathol.* **227,** 165–174 (2012).

189. Galán, M. *et al.* A novel role for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and its downstream endoplasmic reticulum stress in cardiac damage and microvascular dysfunction in type 1 diabetes mellitus. *Hypertens. Dallas Tex 1979* **60,** 71–80 (2012).

190. Sheikh-Ali, M., Sultan, S., Alamir, A.-R., Haas, M. J. & Mooradian, A. D. Hyperglycemia-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **26,** 1146–1150 (2010).

191. Sheikh-Ali, M., Sultan, S., Alamir, A.-R., Haas, M. J. & Mooradian, A. D. Effects of antioxidants on glucose-induced oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **87,** 161–166 (2010).

192. Bakker, W., Eringa, E. C., Sipkema, P. & van Hinsbergh, V. W. M. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res.* **335,** 165–189 (2009).

193. Delibegovic, M. *et al.* Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* **58,** 590–599 (2009).

194. Gu, F. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase 1B potentiates IRE1 signaling during endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **279,** 49689–49693 (2004).

195. Bettaieb, A. *et al.* Differential regulation of endoplasmic reticulum stress by protein tyrosine phosphatase 1B and T cell protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* **286,** 9225–9235 (2011).

196. Eglen, R. M., Cornett, C. M. & Whiting, R. L. Interaction of p-F-HHSiD (p-Fluoro-hexahydrosila-difenidol) at muscarinic receptors in guinea-pig trachea. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **342,** 394–399 (1990).

197. Kobayashi, M., Inoue, K., Warabi, E., Minami, T. & Kodama, T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J. Atheroscler. Thromb.* **12,** 138–142 (2005).

CC BY NC ND

198. Tovey, S. C. & Willars, G. B. Single-cell imaging of intracellular Ca2+ and phospholipase C activity reveals that RGS 2, 3, and 4 differentially regulate signaling via the Galphaq/11-linked muscarinic M3 receptor. *Mol. Pharmacol.* **66,** 1453–1464 (2004).

199. Ellman, G. L. & Callaway, E. Erythrocyte cholinesterase-levels in mental patients. *Nature* **192,** 1216 (1961).

200. Spitzer, R. & Jain, A. N. Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **26,** 687–699 (2012).

201. Kruse, A. C. *et al.* Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **482,** 552–556 (2012).

202. Kruse, A. C. *et al.* Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **504,** 101–106 (2013).

203. Munaron, L. & Fiorio Pla, A. Endothelial calcium machinery and angiogenesis: understanding physiology to interfere with pathology. *Curr. Med. Chem.* **16,** 4691–4703 (2009).

204. Padhye, L. P., Yao, H., Kung'u, F. T. & Huang, C.-H. Year-long evaluation on the occurrence and fate of pharmaceuticals, personal care products, and endocrine disrupting chemicals in an urban drinking water treatment plant. *Water Res.* **51,** 266–276 (2014).

205. Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q. & Zheng, J. N. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol. Med. Rep.* **11,** 1566–1572 (2015).

206. Clere, N. *et al.* Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis. *Int. J. Cancer* **127,** 2279–2291 (2010).

207. CHEN, W., MAO, K., LIU, Z. & DINH-XUAN, A. T. The role of the RhoA/Rho kinase pathway in angiogenesis and its potential value in prostate cancer (Review). *Oncol. Lett.* **8,** 1907–1911 (2014).

208. N'guessan, R., Knols, B. G. J., Pennetier, C. & Rowland, M. DEET microencapsulation: a slow-release formulation enhancing the residual efficacy of bed nets against malaria vectors. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **102,** 259–262 (2008).

cc BY NC ND

209. Pennetier, C. *et al.* Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerg. Infect. Dis.* **14,** 1707–1714 (2008).

210. Pennetier, C. *et al.* Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against Anopheles gambiae. *Malar. J.* **6,** 38 (2007).

211. Pennetier, C. *et al.* Synergy between repellents and organophosphates on bed nets: efficacy and behavioural response of natural free-flying An. gambiae mosquitoes. *PloS One* **4,** e7896 (2009).

212. Legeay, S. *et al.* The insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) induces angiogenesis via allosteric modulation of the M3 muscarinic receptor in endothelial cells. *Sci. Rep.* **6,** 28546 (2016).

213. Huang, K.-L., Chen, T.-S., Chen, P.-H. & Kuo, Y.-M. Degradation of N,N-diethyl-m-toluamid (DEET) on lead dioxide electrodes in different environmental aqueous matrixes. *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* **50,** 931–940 (2015).

214. Zhang, N.-S., Liu, Y., Van den Brink, P. J., Price, O. R. & Ying, G.-G. Ecological risks of home and personal care products in the riverine environment of a rural region in South China without domestic wastewater treatment facilities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **122,** 417–425 (2015).

215. Fairbairn, D. J. *et al.* Sources and transport of contaminants of emerging concern: A two-year study of occurrence and spatiotemporal variation in a mixed land use watershed. *Sci. Total Environ.* **551–552,** 605–613 (2016).

216. 003548 - C57BL/6-Ins2<Akita>/J. Available at: https://www.jax.org/strain/003548. (Accessed: 23rd June 2016)

217. Jeon, S.-M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp. Mol. Med.* **48,** e245 (2016).

218. Ewart, M.-A. & Kennedy, S. AMPK and vasculoprotection. *Pharmacol. Ther.* **131,** 242–253 (2011).

219. Kandadi, M. R. *et al.* Deletion of protein tyrosine phosphatase 1B rescues against myocardial anomalies in high fat diet-induced obesity: Role of AMPK-dependent autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1852,** 299–309 (2015).

220. Morrow, V. A. *et al.* Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **278,** 31629–31639 (2003).

221. Thiebaut, P.-A., Besnier, M., Gomez, E. & Richard, V. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in cardiovascular diseases. *J. Mol. Cell. Cardiol.* doi:10.1016/j.yjmcc.2016.09.002

222. Bettaieb, A. *et al.* Pancreatic Protein Tyrosine Phosphatase 1B Deficiency Exacerbates Acute Pancreatitis in Mice. *Am. J. Pathol.* **186,** 2043–2054 (2016).

223. Green, J. J. *et al.* Electrostatic Ligand Coatings of Nanoparticles Enable Ligand-Specific Gene Delivery to Human Primary Cells. *Nano Lett.* **7,** 874–879 (2007).

224. Lee Chung, B. *et al.* Nanomedicines for endothelial disorders. *Nano Today* **10,** 759–776 (2015).

BY NC ND

CC BY NC ND

PUBLICATIONS – COMMUNICATION

Articles et chapitres :

Legeay S. *et al.* (2016). The insect repellent *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) induces angiogenesis via allosteric modulation of the M3 muscarinic receptor in endothelial cells. *Sci Reports*, 6, Article number: 28546.

Legeay S. *et al.* (2015). Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome. *Nutrients*, Vol 7, Issue 7, p5443-5468.

Legeay S. et Faure S. (2016 sous presse – Elsevier). *Pharmacologie des médicaments des systèmes cardiovasculaire et respiratoire* – Chapitre 16 : Les médicaments de l'asthme et de la BPCO.

Communications orales :

"The insect repellent *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) induces angiogenesis via allosteric modulation of the M3 muscarinic receptor" 24 octobre 2016. 7th Euro-Global Summit on Toxicology and Applied Pharmacology – Rome (Italie).

"The insect repellent *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) induces angiogenesis via allosteric modulation of the M3 muscarinic receptor" 9 juin 2016. **Séminaire** pour le Département de physiologie – Université d'Augusta (Géorgie – USA).

"M3 receptor as a key target of *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) to promote angiogenesis" **Présentation orale** au congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique. 21 au 23 avril 2015, Caen (France).

"Prévenir le syndrome métabolique avec le thé vert : état des lieux des connaissances". **Présentation orale**. Congrès de la Société Française des Antioxydants. 15 octobre 2015, Paris (France).

Communication écrite :

"M3 receptor as a key target of *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) to promote angiogenesis" **Poster** à la journée scientifique de la SFR ICAT. 27 mai 2015, Angers (France).

CC BY NC ND

CC BY NC ND

ANNEXE 1 : Publication

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Received: 25 January 2016
Accepted: 06 June 2016
Published: 27 June 2016

The insect repellent *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) induces angiogenesis *via* allosteric modulation of the M3 muscarinic receptor in endothelial cells

Samuel Legeay[1], Nicolas Clere[1], Grégory Hilairet[1], Quoc-Tuan Do[2], Philippe Bernard[2], Jean-François Quignard[3], Véronique Apaire-Marchais[4], Bruno Lapied[4] & Sébastien Faure[1]

The insect repellent *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) has been reported to inhibit AChE (acetylcholinesterase) and to possess potential carcinogenic properties with excessive vascularization. In the present paper, we demonstrate that DEET specifically stimulates endothelial cells that promote angiogenesis which increases tumor growth. DEET activates cellular processes that lead to angiogenesis including proliferation, migration and adhesion. This is associated with an enhancement of NO production and VEGF expression in endothelial cells. M3 silencing or the use of a pharmacological M3 inhibitor abrogates all of these effects which reveals that DEET-induced angiogenesis is M3 sensitive. The experiments involving calcium signals in both endothelial and HEK cells overexpressing M3 receptors, as well as binding and docking studies demonstrate that DEET acts as an allosteric modulator of the M3 receptor. In addition, DEET inhibited AChE which increased acetylcholine bioavailability and binding to M3 receptors and also strengthened proangiogenic effects by an allosteric modulation.

The synthetic compound DEET (*N,N*-diethyl-*meta*-toluamide) is the most effective and widely used insect repellent[1] in the world. The development and use of DEET to reduce disease transmission has undoubtedly increased patient survival since its introduction as an insect repellent. A small number of toxic side effects associated with the use of DEET in humans have been reported including seizures[2] and Gulf War Syndrome[3,4]. Also, DEET may have carcinogenic properties, as have been found in human nasal mucosal cells[5] or in Hodgkin lymphoma and soft tissue sarcomas[6]. Despite its discovery more than fifty years ago, the mode of action of DEET in insects has not been fully elucidated. In addition to the recent report showing that the neuronal insect ionotrope receptor Ir40a accounts for the widespread effect of DEET-induced repellency[7], there is evidence that DEET inhibits acetylcholinesterase (AChE) activity in mosquitoes and humans[8,9]. AChE is not confined to the neuronal system and is expressed concurrent with acetylcholine receptors in a wide variety of cell types including epithelial, blood[10], vascular endothelial (EC)[11] and tumor cells[12,13]. The AChE inhibitor donepezil promotes angiogenesis[14] both in EC and in a murine ischemic hind limb model. These findings have recently been confirmed by an *in vitro* study which shows that EC possess an autocrine non-neuronal cholinergic system that is able to regulate angiogenesis[15].

Angiogenesis and vascular process are essential for tumor growth and metastasis[16]. Various cancers derived from epithelial cells[17,18] express a cholinergic autocrine loop. Indeed, ACh secreted by tumor cells and neighboring cells interacts primarily with M3 muscarinic receptors expressed on tumor cells to stimulate tumor growth[19]. In non-small cell lung cancer, M3 receptor expression is associated with tumor progression and poor survival outcome[20]. Studies also show an increase of tumor angiogenesis through activation of M3 receptors in a mouse model of tumor-xenograft[21,22]. However, whether DEET interferes with angiogenesis is not known. The present study

[1]University Bretagne Loire, Université d'Angers, UFR santé, département pharmacie, Angers, France. [2]GreenPharma S.A.S. 03 allée du titane, 45100 Orléans, France. [3]Inserm U1045-Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Université de Bordeaux, France. [4]Laboratoire des Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES-EA 2647, USC INRA 1330, Angers, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.F. (email: sebastien.faure@univ-angers.fr)

CC BY NC ND

has been designed to: (i) establish the angiogenic properties of two relevant concentrations of DEET (10^{-5} M, a plasma concentration common in exposed humans and 10^{-8} M, a concentration found in surface water and wastewater)[23,24] and (ii) determine the key targets involved in the control of this pathophysiological process with respect to the regulation of the M3 receptor.

Material and Methods

Ethical approval. All procedures involving animals, including the breeding protocols, were conducted in accordance with protocols approved by the ethical committee of the University of Angers and the regional ethics committee on animal testing. Furthermore, these experiments were approved by the ethical committee of the University of Angers and the regional ethics committee on animal testing (Authorization no. C49063, 11/22/2011). Furthermore, animal experiments were carried out in strict accordance with recommendations in the guidelines of the Code for Methods and Welfare Considerations in Behavioral Research with Animals (Directive 86/609EC).

Cell culture. Human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) obtained from male newborns were purchased from Lonza (CC2519) and grown in plastic flasks in EBM-2 medium (Lonza, CC3156) containing 1% L-glutamine (Lonza, BE17-605E), 1% streptomycin/penicillin (Lonza, DE17-602E) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, 10270-106). HUVEC were used between the second and fourth passage. Cells were incubated for 24 h either in the absence or presence of DEET (Sigma–Aldrich, 1197007) used at the two concentrations 10^{-8} M and 10^{-5} M. In order to test the involvement of the M3 receptor, experiments were carried out either in the absence or presence of the selective M3 antagonist, *para*-fluorohexahydrosiladiphenidol (pFHHSiD, Sigma–Aldrich, H127) (pA2 = 7.9)[25].

Primary EC were isolated from Swiss mice aortas. The extraction method was adapted from Kobayashi's protocol[26]. Murine EC were cultured in growth medium EBM-2 supplemented with 5% heat-inactivated FBS and were used until their fourth passage.

Human embryonic kidney 293 (HEK-293) cells expressing recombinant $G_{\alpha q/11}$-coupled muscarinic M3 receptors (HEK-293/M3) were a generous gift from Dr Gary B. Willars[27]. These cells have been cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Lonza, BE12-604F), supplemented with 500 μg.mL^{-1} of geneticin (G-418) (Sigma–Aldrich, A1720), 1% of penicillin/streptomycin and 10% of heat-inactivated FBS.

U87MG glioblastoma-astrocytoma cells and B16F10 melanoma cells were a generous gift from Inserm 1066 MINT laboratory (Angers- France). These cells were cultured in DMEM, supplemented with 1% of L-glutamine, 1% of penicillin/streptomycin and 10% of heat-inactivated FBS.

Proliferation assay of HUVEC and tumor cell lines. Effects of the two concentrations of DEET on HUVEC, U87MG or BF16F10 proliferation were analyzed by using CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Molecular Probes, C7026). Briefly, 5.10^3 cells per well were seeded into 96-well plates and allowed to attach overnight before being treated with DEET for 24 h. After growth medium removal, dye-binding solution was added into each microplate well and cells were incubated at 37 °C for 30 min. The fluorescence levels were detected on a Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) multimode microplate reader with filters for 485 nm excitation and 530 nm emission.

Cell viability assay (MTT). HUVEC were seeded at 10^4 cells per well on 96-well plates. Cells were treated with DEET for 24 h. Viability was assessed by colorimetric analysis of MTT (Sigma-Aldrich, M5655). Absorbance values were obtained at a wavelength of 570 nm on a multimode microplate reader (Mithras LB940).

Apoptosis measurement by flow cytometry. HUVEC were exposed either to DEET or actinomycin D, 1 μM as a positive control (Sigma–Aldrich, A9415) for 24 h and then fixed in 70% ethanol at 4 °C for at least 4 h. After a centrifugation at 1,500 × *g* for 5 min, cells were re-suspended in PBS containing 0.05 mg.mL^{-1} RNase (Sigma-Aldrich, R6513) and 10 μg.mL^{-1} propidium iodide (Sigma-Aldrich, P4170). Cellular DNA content was analyzed on a Cytomics FC500 MPL flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). In all cases, 10,000 events were collected for analysis.

RNA interference and transient transfection. To silence the M3 muscarinic acetylcholine receptor, siRNA duplexes specific for human M3 were obtained from Santa Cruz Biotechnology (SC35833). Transient transfection of HUVEC was performed according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were seeded in six-well plates, grown for 24 h to 60% confluence and then transiently transfected with 10 nM of M3-specific or control siRNA using the transfection reagent provided, which also served as control without siRNA. Medium was replaced 24 h later by fresh medium and cells were grown for an additional 24 h.

***In vitro* capillary network formation on ECM gel.** HUVEC were treated with DEET for 24 h before being detached with trypsin EDTA acid. Cells were seeded at a density of 1.5×10^5 cells per well. Each well was precoated with ECM gel (Sigma–Aldrich, E1270). Briefly, 150 μL of ECM gel was added into a 4-well plate and allowed to solidify for 1 h at 37 °C. Then, cells were incubated with medium containing 10% of FBS and allowed to adhere for 1 h after which the different stimuli were added. Tube formation was examined by phase-contrast microscopy (MOTIC AE21) after 24 h and the average length of capillaries was quantified using ImageJ software.

***In vivo* ECMgel plug assay.** All studies involving mice were in accordance with European guidelines and with the agreement of the regional veterinary services (Authorization no. C49063, 11/22/2011). Six week-old male Swiss mice were used.

CC BY NC ND

Primary mouse EC were cultured in a 25 cm^2 flask and were treated with DMSO or DEET for 24 h in the absence or presence of pFHHSiD (10^{-7} M). After treatment, cells were detached and mixed with 500 μL of ECMgel with recombinant bFGF (300 ng.mL^{-1}, Peprotech, 100-18B). This mixture was injected subcutaneously on the back of male Swiss mice. At day 14, ECMgel plugs were removed and homogenized in lysis buffer and incubated for 24 h at 4 °C and then disrupted with a Polytron (PRO250, Monroe, CT). Hemoglobin concentration was measured in the supernatants with Drabkin's reagent (Sigma-Aldrich, D5941) according to the manufacturer's instructions.

Ectopic human glioma model in nude mice. Six week-old nude Swiss mice (Janvier SAS, Le Genest Saint Isle, France) were housed and maintained at the University animal facility. Tumor-bearing mice were prepared by injecting subcutaneously a suspension of 10^6 U87MG glioblastoma-astrocytoma cells in 100 μL of DMEM solution into the right flank of athymic nude Swiss mice. From a volume of 100 mm^3, mice were daily treated either by solvent, 10^{-5} M DEET, 10^{-7} M pFHHSiD or 10^{-5} M DEET plus 10^{-7} M pFHHSiD for 28 days. At the end of the protocol, mice were sacrificed and tumors were resected.

Microvascular density (MVD) analysis. Tumors were included in paraffin blocks and sections of 5 μm were obtained with a microtome and deposed on polylysinated slides. Tumor sections were deparaffinized and endogenous peroxide production was inhibited with 1% hydrogen peroxide (Sigma Aldrich, 216763) for 15 min. Protein-protein links were lysed by 0.05% of pepsin in HCl 0.01 N for 30 min at 37 °C and nonspecific protein binding was blocked with 2% BSA for 30 min. 5 μm sections were incubated overnight at 4 °C with anti-mouse CD31 antibody (1:500 in BSA 2%, BD Bioscience, 557355). Sections were then incubated for 30 min with peroxidase-labeled biotinylated anti-rat antibody (1:100 in BSA 2%, Vector Laboratories, Vectastain) at room temperature for 30 min. Staining was amplified with avidin-biotin complex (Vector Laboratories, Vectastain) and signal was detected with diaminobenzidine (DAB) peroxidase substrate (Sigma-Aldrich, D12384) after an incubation of 10 min. Finally, sections were counterstained with hematoxylin for 20 s. Each tumor section was photographed 4 times by two independent manipulators with a white light microscope (objective X20).

Biochemical assay of AChE activity. AChE activity was assayed using the Ellman's method[28]. HUVEC (10^5 cells per mL) were grown on 96-well plates for 24 h in presence of DEET at final dilution 10^{-5} M or 10^{-8} M. DEET-treated cells were then incubated for 60 min with 100 μL of 2 mM acetylthiocholine iodide (ATC, Sigma-Aldrich, A5751) and 100 μL of dithio-dinitrobenzoate (DTNB, 1 mM, Sigma-Aldrich, D8130) in 0.1 M phosphate buffer pH 8.1. AChE activity was measured at 37 °C by absorbance at 405 nm using a microplate reader (Mithras LB940). BW284c51 10^{-5} M (Sigma-Aldrich) was used as control as acetylcholinesterase inhibitor. Results were expressed as a percentage of initial activity (without inhibitor).

Adhesion assay on HUVEC. 5.10^3 cells per well were seeded into 96-well plates and were treated for 24 h with DEET. After incubation, the plate was shacked for 15 s. The supernatant with non-adherent cells was removed by three washes with washing buffer (0.1% BSA in medium without serum). Attached cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Cells were rinsed two times with washing buffer, stained with crystal violet (1 mg.mL^{-1} in 2% of ethanol) for 10 min at room temperature and extensively washed with distilled water. Then, SDS 2% was added and incubated for 30 min at room temperature. Absorbance was then evaluated using a Mithras LB940 multimode microplate reader at 550 nm (Berthold Technologies).

Migration assay. HUVEC were detached, washed twice in PBS and re-suspended in EBM-2 medium with 10% FBS. 5.10^4 cells were seeded in the upper chamber of a Transwell insert (PTFE membrane with 8 μm diameter pores, Corning). The lower chamber was filled with 1 mL of EBM-2 with 20% FBS with or without DEET. After 24 h, migrated cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. Cells were rinsed two times with washing buffer, stained with crystal violet (1 mg.mL^{-1} in 2% of ethanol, Sigma–Aldrich, C6158) for 10 min at room temperature and extensively washed with distilled water. Then, SDS 2% was added and incubated for 30 min at room temperature. Absorbance was then evaluated using a Mithras LB940 multimode microplate reader at 550 nm (Berthold Technologies).

Western blot. After treatment, cells were homogenized and lysed. Proteins (30 μg) were separated on 10% SDS–polyacrylamide gel electrophoresis. Blots were probed with peNOS-Ser, peNOS-Thr (Cell Signaling, #9571, #9574), eNOS (BD Biosciences, 610297), p-FAK (Cell Signaling Technology, #3284) and VEGF antibodies (Santa Cruz Biotechnology, SC152). Monoclonal anti-β-actin antibody (Sigma–Aldrich, A5316) was used to visualize protein gel loading. The membranes were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, SC2313 and SC2005). The protein–antibody complexes were detected by ECL plus (Thermo Scientific, #34096).

Confocal microscopy. Once treated for 24 h with 10^{-8} M or 10^{-5} M DEET, HUVEC were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS and then blocked with 5% BSA in PBS for 1 h at room temperature. Cells were treated with a rabbit polyclonal p-FAK (Cell Signaling Technology, #3284) antibody in 5% BSA in PBS overnight at 4 °C. After washing with PBS, cells were treated with Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit antibody (Molecular probe, 31210) in 5% BSA in PBS for 1 h at room temperature.

In another set of experiments, tetramethylrhodamine isothiocyanate-phalloidin (Phalloidin, Sigma–Aldrich, P1951) was used to label actin fibers. After treatments, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and then stained with phalloidin (50 μg.mL^{-1}) for 30 min at room temperature. After washing with PBS, cells were mounted and visualized with a confocal microscopy (CLMS 700, Zeiss, ZEN software).

BY NC ND

NO and superoxide anion (O_2^-) determinations by electron paramagnetic resonance (EPR). Detection of NO production was performed using Fe^{2+} diethyldithiocarbamate (DETC, Sigma-Aldrich, D95503) as spin trap. Cells were treated with DEET for 24 h; medium was replaced with 250 μL of Krebs solution, then treated with 250 μL of colloid $Fe(DETC)_2$ and incubated for 45 min at 37 °C. Cells were then scrapped and frozen in plastic tubes. NO detection was measured *in situ* by EPR. Values are expressed as amplitude of signal per protein concentration (unit.μg^{-1}.μL of endothelial cell proteins).

For O_2^- quantification, cells were allowed to equilibrate in deferoxamine-chelated Krebs-Hepes solution containing 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH; Noxygen, NOX-02) (500 μM), deferoxamine (25 μM), and DETC (5 μM) under constant temperature (37 °C) for 20 min. Cells were then scrapped and frozen in plastic tubes and analyzed by EPR spectroscopy. Values are expressed as percentage of control.

Ca^{2+} response measurement. HUVEC were cultured on 8 wells μ-slides (Ibidi, Martinsried) and HEK293/M3 cells were cultured on a poly-L-lysine-coated 8 wells μ-slide (Ibidi, Martinsried) for 24 h before being washed with a Krebs solution (NaCl 119 mM, KCl 4.75 mM, $MgSO_4$ 1.17, $CaCl_2$ 2.5 mM, KH_2PO_4 1.18, $NaHCO_3$ 25 mM, Glucose 11.1 mM, Hepes 20 mM, pH = 7.40) and loaded with the molecular probe fluo-4 (3 μM, Molecular probe, F14204) for 30 min at 37 °C. Next, the cells were washed with Krebs solution and visualized with a confocal microscopy (CLMS 700 Zeiss, 488 nm/510 nm, ZEN software). After stabilization of the basal fluorescence, cells were stimulated with carbachol or ACh (10^{-10} M to 10^{-5} M) in presence or absence of DEET 1 min before. Images were acquired each second for 10 min using an X20 objective. Results are expressed in mean ± SEM of the ratio of maximal fluorescence divided by basal fluorescence.

Docking. Primary sequence of M3 receptors are retrieved from Uniprot website (www.uniprot.com). Crystal structures of the muscarinic receptors are retrieved from the Protein Databank at www.rcsb.org.

Sequence alignment was performed with ClustalW[29] as implemented at https://npsa-prabi.ibcp.fr/.

Surflex-Dock software[30] as implemented in Sybyl-X 2.1 package (Tripos, MO, USA) was used for the docking simulation. The docking mode was GeomX with default options to have maximum accuracy. Prior to docking, the interaction cavity was defined with a "protomol" which represents the "negative of the cavity" in terms of acceptor, donor and hydrophobic groups. The protomol was generated according to the putative allosteric site defined by aligning 3D structure of M3 (PDB id: 4DAJ)[31] with M2 (PDB id: 4MQT)[32]. To generate the protomol, these options were used: proto_thresh = 0.5 and proto_bloat = 0. Parameters used for the docking calculation were those by default: no flexibility on the protein, additional starting conformations per molecule multistart = 6, expand search grid grid_bloat = 6 Å, maximum conformations per fragment maxconfs = 20, maximum number of rotatable bonds per molecule maxrot = 100, allow ring flexibility in the molecule (+ring), soft grid treatment (+soft_box), pre- and post-docking minimization (+premin & +remin), fragment molecule (+frag), activate spin alignment method (+spinalign), density of search spindens = 9 for exhaustive accuracy, number of spins per alignment nspin = 12. Poses with a root mean square distance above div_rms = 0.5 Å are retained and a total of ndoc_final = 20 poses are output; for each pose, a calculated affinity expressed as −Log10(Kd) is given.

Binding assay. Binding assay was performed by CEREP (Paris, France). Briefly, human recombinant M3 purified receptor (0.2 nM, CHO cell lines) is mixed with 0.2 nM [^{3}H]-4-DAMP and the complex incubated for 60 min at room temperature in the absence or presence of DEET 10^{-11} M to 10^{-4} M. Nonspecific binding is determined in the presence of atropine (10 μM). The detection was realized by scintillation counting. The results are expressed as a percent inhibition of the control [^{3}H]-4-DAMP specific binding. The standard reference compound is 4-DAMP, which is tested in each experiment at several concentrations to obtain a competition curve from which IC_{50} was calculated.

Statistical analysis. Data are presented as mean ± SEM, *n* represents the number of experiments. For Ca^{2+} measurement, statistical analysis was performed by one-way ANOVA test. For other experiments, one-way non-parametric Kruskal-Wallis test followed by a Bonferroni correction were performed. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

DEET specifically stimulates endothelial cell to promote angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. Tumor progression is a process that involves several cell types including cancer cells and endothelial cells. Cancer cells initiate tumor growth and endothelial cells are involved in angiogenesis, an essential process in the promotion of tumor growth and metastasis. The first step of the present study was to determine the cellular target that might be involved in the potential carcinogenic properties of DEET. We therefore analyzed the effect of DEET on proliferation of either U87MG cells or HUVECs. As shown in Table 1, DEET (10^{-8} M or 10^{-5} M) did not increase proliferation of cancer U87MG cells whereas it enhanced HUVEC proliferation when compared with non-treated cells. Since DEET is commonly applied onto the skin, the effects of DEET on B16F10 melanoma cell proliferation have been evaluated. No effect of DEET on the proliferation of B16F10 tumor cell line was observed (Supplemental Figure S1). To ensure the lack of cytotoxicity and apoptotic effects of DEET on HUVEC, viability and apoptosis measurements were performed for each concentration. Neither cytotoxic nor pro-apoptotic effects were observed in cells treated with DEET whereas actinomycin D (10^{-6} M) increased HUVEC apoptosis (Supplementary Figure S2a,b). These results show that DEET promotes endothelial cell, but not cancer cell, proliferation.

The effects of DEET were studied through *in vitro* angiogenesis analysis. DEET treatment with 10^{-8} M or 10^{-5} M increased capillary length formation in HUVEC (Fig. 1a,b, white columns). Compared to control, treatment with DEET concentrations ranging from 10^{-14} to 10^{-5} M revealed that capillary length reaches a plateau at

CC BY NC ND

Proliferation (% of control ± SEM)	DEET 10^{-8}M	DEET 10^{-5}M	pFHHSiD 10^{-7}M DEET 10^{-8}M	pFHHSiD 10^{-7}M DEET 10^{-5}M
U87MG	98.21 ± 1.59	97.18 ± 1.28	/	/
HUVEC	113.55 ± 3.16*	112.03 ± 2.90*	102.79 ± 5.41	100.82 ± 5.23

Table 1. Endothelial cells are the main targets of DEET. CyQUANT assay reveals that both concentrations of DEET (10^{-8}M and 10^{-5}M) do not increase proliferation of U87MG cell line while increasing HUVEC one after 24 h treatment. The selective M3 muscarinic receptor antagonist pFHHSiD prevents the DEET-induced endothelial proliferation. Results are expressed at mean ± SEM; *$p < 0.05$ compared to control (Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test).

10^{-8}M DEET (Supplementary Figure S2). There was no significant difference in *in vitro* pro-angiogenic effects of HUVECs treated with DEET in the 10^{-8}M and 10^{-5}M concentration range.

To ascertain the effects of DEET on new vessel formation, we performed *in vivo* neovascularization studies. After 14 days, hemoglobin content was significantly increased in mice injected with endothelial cells that were previously cultured with 10^{-8}M or 10^{-5}M DEET (Fig. 1c, white columns).

In addition, DEET-induced neovascularization was studied in U87MG xenografted mice that were daily treated with DEET (intraperitoneal injection) at doses known to induce a plasma concentration of 10^{-5}M, a concentration observed in exposed humans[23]. Detectable tumors (i.e. tumors >100 mm^3) were observed 14 days after U87MG cell injection in mice. On day 28, tumor growth was significantly enhanced in mice treated with DEET compared to control mice (Fig. 1d, squares). Furthermore, CD31 staining of the tumors revealed that DEET significantly enhanced the area of capillaries but not microvascular density. (Fig. 1e–g).

DEET induces pro-angiogenic effects through an M3 receptor-sensitive pathway and inhibits AChE activity. To determine the involvement of muscarinic receptors on DEET-induced proliferation, HUVEC were treated with 10^{-8}M or 10^{-5}M DEET in the presence of pFHHSiD (10^{-7}M), a selective antagonist of M3 receptor. pFHHSiD completely prevented the proliferative properties of DEET for each concentration (Table 1).

Whether DEET increases capillary length was also investigated in HUVEC cells under these conditions. Similarly, pFHHSiD significantly prevented DEET-induced capillary length (Fig. 1a,b, grey columns). Furthermore, similar experiments were conducted with M3 siRNA. Although siRNA control was not effective in promoting the formation of capillaries, silencing of the M3 muscarinic receptor abolished the ability of DEET to increase capillary length (Fig. 1a,b, black columns).

In addition, *in vitro* vessel formation induced by 10^{-8}M or 10^{-5}M DEET and *in vivo* neovascularization were completely prevented by pFHHSiD (Fig. 1c,d, circles). These results revealed that DEET promotes angiogenesis through a pathway sensitive to a selective antagonist of M3 receptor or a M3 siRNA.

AChE is a molecular target of DEET. Drugs, such as donepezil, act as an AChE inhibitor and are able to promote angiogenesis both in *in vitro* EC and in a murine ischemic hind limb model[14]. We tested the effect of both concentrations of DEET on AChE enzyme activity in HUVEC. Low (10^{-8}M) and high (10^{-5}M) concentrations of DEET decreased endothelial AChE activity compared to the control condition (Fig. 2).

DEET stimulates endothelial cell migration, adhesion as well as expression of known endothelial markers of angiogenesis. 10^{-8}M and 10^{-5}M concentration of DEET in HUVECs significantly enhanced endothelial cell migration and adhesion compared to non-treated cells (Table 2). These effects were completely prevented by pFHHSiD (Table 2). We then investigated the expression and the activation of proteins involved in cell migration and/or adhesion. The two concentrations of DEET increased the phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) without modifying its expression (Fig. 3a). Furthermore, pFHHSiD prevented DEET-induced FAK phosphorylation (Fig. 3a). Likewise, phalloidin staining confirmed that DEET is able to induce formation of stress fibers in HUVEC (Fig. 3b).

Nitric oxide (NO) is involved in the angiogenic process[33], therefore, NO production in HUVEC stimulated with DEET was investigated. Endothelial NO production increased with DEET treatment compared to control cells, but this only reached significance in the 10^{-8}M dose (Fig. 3c). To determine the molecular changes governing DEET-induced NO production, the expression and activation of eNOS were analyzed by Western blot. Although treatment with DEET did not modify eNOS expression, it significantly increased eNOS phosphorylation on its activator site (Ser-1177) while decreasing it at the inhibitor site (Thr-495) compared to non-treated cells (Fig. 3d). In addition, after normalization of the amount of phosphorylated eNOS to total amount of the enzyme, the ratio of phosphorylated eNOS at the activator and inhibitor sites was calculated. This ratio was significantly increased in HUVEC treated with each concentration of DEET compared with non-treated cells (Fig. 3d).

NO bioavailability depends on superoxide anion (O_2^-) production in endothelial cells. To ensure that O_2^- did not reduce NO bioavailability, the quantification of O_2^- production was assessed by EPR and revealed that neither 10^{-8}M (99.8 ± 8.9%) nor 10^{-5}M (80.4 ± 11.4%) DEET concentrations modified O_2^- production compared with control cells (100%).

Finally, the expression of one of the central pro-angiogenic factors, VEGF, was analyzed by Western blot. DEET significantly enhanced VEGF expression which was completely prevented with pFHHSiD (Fig. 3e).

CC BY NC ND

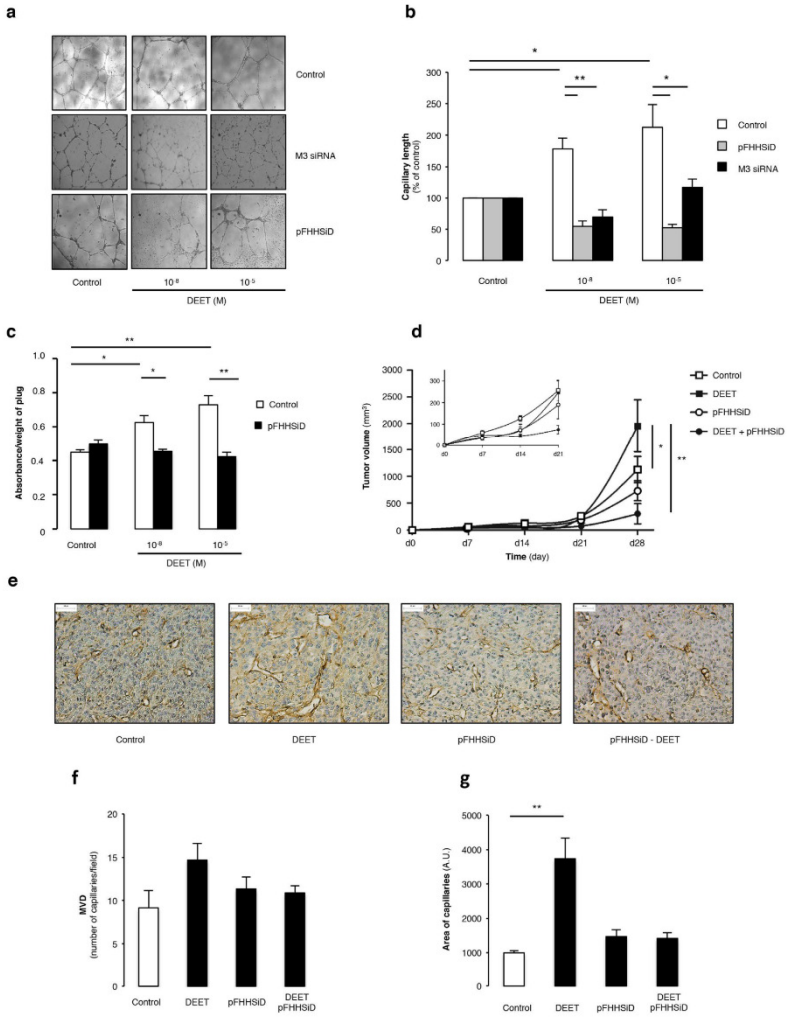


Figure 1. ***In vitro* and *in vivo* pro-angiogenic properties of DEET.** (**a**) Representative illustrations of HUVEC on ECMgel, treated during 24 h in absence or presence of DEET 10^{-8} M or 10^{-5} M with or without pFHHSiD 10^{-7} M or silenced with specific M3 receptor siRNA. (**b**) DEET enhances *in vitro* capillary formation. Pharmacological blockade with pFHHSiD or silencing with specific siRNA against M3 muscarinic receptor were used. Reproducible data were obtained from four independent experiments. (**c**) DEET promotes *in vivo* neovascularization in ECMgel model. At day 14, quantitative measurement of hemoglobin was reported as absorbance (arbitray units)/weight of plugs. Hemoglobin content is increased in plugs containing mouse aortic-derived EC pretreated with DEET. Data were obtained from four independent experiments. Results are expressed at mean ± SEM. (**d**) DEET potentiates *in vivo* tumor growth. U87MG cells (10^6) were injected subcutaneously into the flank of six-week old female nude Swiss mice. Mice were chronically treated with 10^{-5} M DEET or its solvent (saline). The treatment was initiated the day following tumor cell injection and tumor dimensions were measured weekly. Pharmacological blockade with pFHHSiD prevents DEET-induced tumor growth. Data are expressed as tumor volume (mm^3) and are presented as mean ± SEM (n = 6 *per* group). (**e**) DEET increases tumor-associated neovascularization. A representative paraffin section of tumor from each group (n = 6) is shown and reveals CD31 staining in brown. (**f**) Mean MVD (number of vessels/field) and mean area of capillaries (**g**) from tumors of mice treated with DEET and/or with pFHHSiD or saline are graphically represented. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$ compared to control (Kruskal-Wallis with Bonferroni correction).

CC BY NC ND

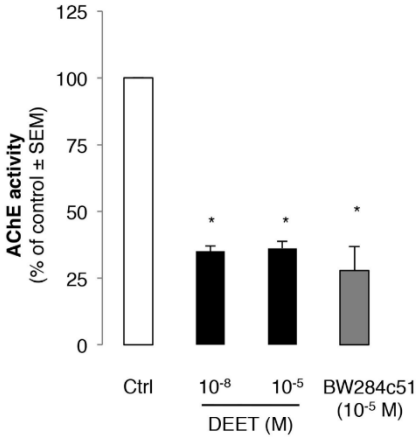


Figure 2. DEET decreases acetylcholinesterase activity on HUVEC. Both DEET concentrations (10^{-8}M and 10^{-5}M) decrease acetylcholinesterase activity on HUVEC. BW284c51 (10^{-5}M) is used as control as acetylcholinesterase inhibitor. Results are expressed as percentage of AChE activity on HUVEC treated with both concentrations of DEET compared to cells treated with solvent. Values are expressed at means ± SEMs from six independent experiments. *$p < 0.05$ compared to control (Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test).

	DEET 10^{-8}M	DEET 10^{-5}M	pFHHSiD 10^{-7}M DEET 10^{-8}M	pFHHSiD 10^{-7}M DEET 10^{-5}M
Adhesion (% of control ± SEM)	139.85 ± 11.94*	142.45 ± 13.89*	94.81 ± 6.07	84.88 ± 7.58
Migration (% of control ± SEM)	122.08 ± 3.92*	133.75 ± 8.21*	47.70 ± 2.49*	79.74 ± 3.71*

Table 2. DEET increases HUVEC adhesion and migration through a pFHHSiD sensitive pathway. Values are expressed as percentage of solvent. Results are expressed at means ± SEMs from four independent experiments. *$p < 0.05$ compared to control (Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test).

DEET acts as an allosteric modulator of the M3 receptor leading to subtle modulation of calcium signaling. Activation of the M3 receptor leads to Ca^{2+} release from inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)-sensitive stores and endothelial calcium signals, which promotes angiogenesis[34,35].

Since the effect of DEET was sensitive to both pharmacological blockade and silencing of M3 receptor, we tested the hypothesis that it may increase calcium signaling. Surprisingly, DEET was not able to increase cytosolic calcium both in HUVEC (data not shown) and HEK/M3 (Fig. 4a,b) for the two concentrations used.

To better characterize the mechanism by which DEET acts on the M3 receptor and due to heterogeneity of carbachol-induced Ca^{2+} response in endothelial cells[36], the effects of DEET on carbachol-induced calcium signaling were evaluated in the same manner as in HEK/M3. As shown in Fig. 4c, carbachol induced a concentration-dependent increase in cytosolic calcium, the maximum being achieved at 1 μM (EC_{50}: $8.51 \times 10^{-8} \pm 0.24 \times 10^{-8}$M). Whatever the concentration of DEET used, it was able to induce a leftward shift of the calcium response induced by carbachol with an EC_{50} equal to $1.53 \times 10^{-8} \pm 0.28 \times 10^{-8}$ and $2.93 \times 10^{-8} \pm 0.15 \times 10^{-8}$M, $p < 0.05$, for 10^{-8}M and 10^{-5}M DEET, respectively (Fig. 4c). Moreover, DEET modulated the Ca^{2+} response induced by 10^{-8}M of carbachol, which corresponds to EC_{50} of carbachol in these conditions, in a window of concentrations beginning at 10^{-8}M and extended to 10^{-7}M (Fig. 4d). These results suggest that DEET, *via* allosteric modulation of the M3 receptor, increases the carbachol-induced calcium rise.

To confirm this hypothesis, docking assay was performed through a docking model of the M3 receptor derived from the structure of PDB (PDB id: 4DAJ[31]) (Fig. 4e,f). As the homology of rat and human M3 receptors is very high (98% of homology, cf. sequence alignment in Supplementary Figure S3) and because the non-conserved residues are located outward of the receptor, the 4DAJ structure was used as our docking model.

The rat M3 receptor (PDB id: 4DAJ[31]) showed a well-defined orthosteric site and revealed the presence of a potential allosteric site (Fig. 4e,f) as compared to the crystal structure of M2 receptor[32].

Thus a docking study was performed to explore the possibility that DEET binds at this putative allosteric site instead of the orthosteric site. The «best pose» ranked by the affinity score had a calculated affinity −Log10(Kd) of 5.04 and 4.35, respectively, for the orthosteric and allosteric site (Fig. 4e,f). In the same manner, a binding assay

BY NC ND

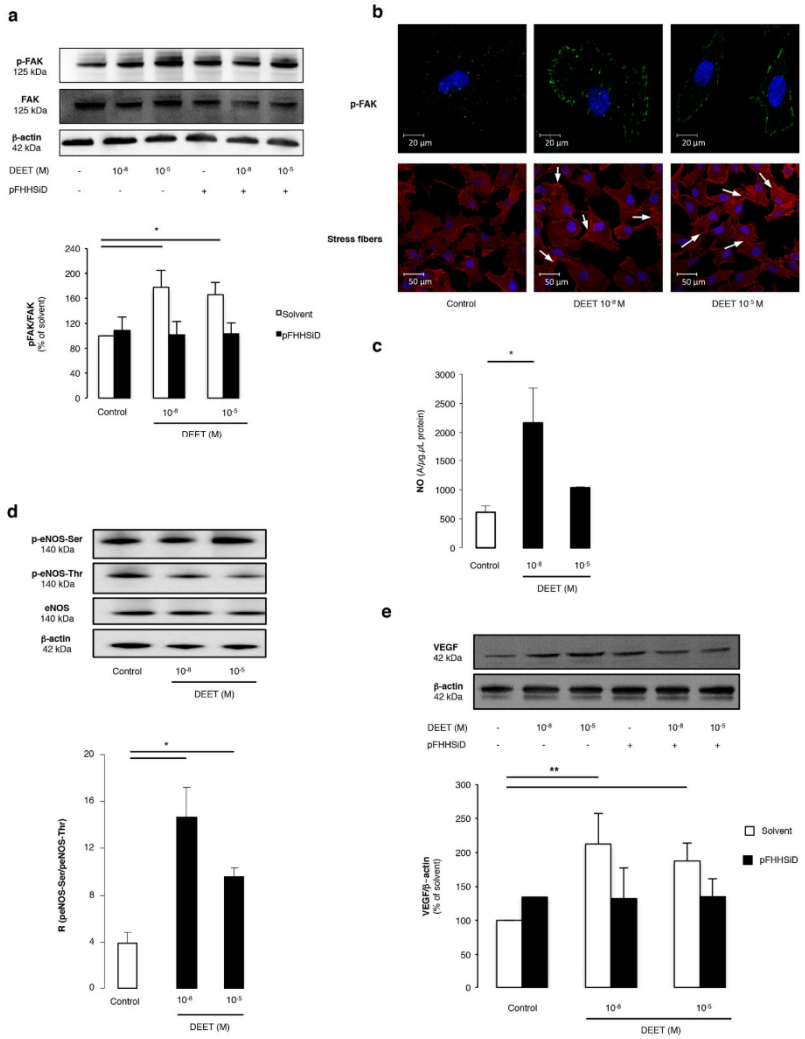


Figure 3. Cellular processes and molecular signaling pathways involved in DEET-induced pro-angiogenic effect. (**a,b**) Western blotting and immunofluorescence staining of HUVEC for p-FAK show an activation of FAK pathway after treatment with DEET for 24 h. Data are obtained from four independent blots. Horizontal bar = 20 µm. To highlight FAK phosphorylation and actin stress fibers, HUVEC were stained with a p-FAK antibody or rhodamine-labelled phalloidin and visualized by confocal microscopy. DEET induces the formation of stress fibers (white arrow). Horizontal bar = 50 µm. (**c**) Quantification of the amplitude of the NO-Fe(DETC)$_2$ complex signal by electron paramagnetic (EPR) in HUVEC reveals a significant increase of NO production in cells treated with 10^{-8} or 10^{-5} M DEET compared with control cells. Values are expressed as units per microgram per microliter of protein in the samples. Results are from four independent experiments. (**d**) Western blot revealed eNOS expression and phosphorylation of Ser-1177 (activator site) and of Thr-495 (inhibitory site). β-actin control is included. DEET (10^{-8} M and 10^{-5} M) increases the ratio between p-eNOS-Ser and p-eNOS-Thr. Results are means ± SEMs from four independent experiments. (**e**) Western blot shows VEGF protein expression after treatment with DEET (10^{-8} M and 10^{-5} M). Ratio between VEGF expression and β-actin expression shows that 10^{-8} M and 10^{-5} M DEET increase VEGF expression. Data are representative of four separate blots. Results are means ± SEM. *$p < 0.05$; **$p < 0.01$ compared to control (Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test).

CC BY NC ND

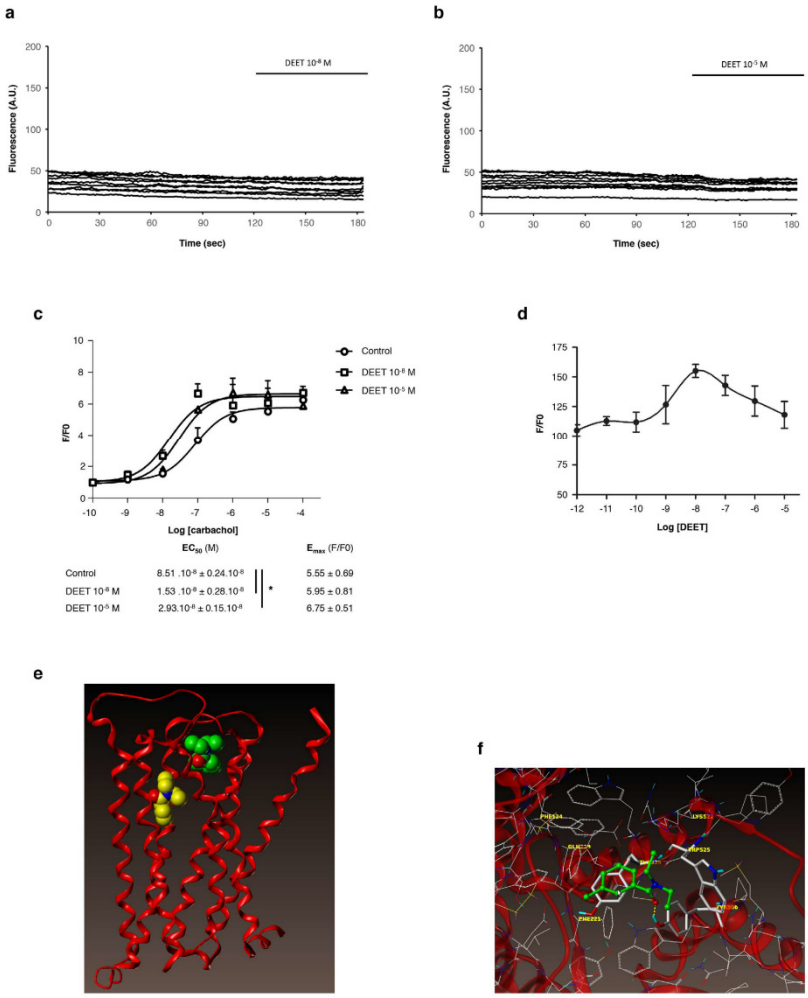


Figure 4. DEET is a modulator of M3 receptor. (**a**,**b**) Time course of the fluorescence of 10 HEK/M3 cells loaded with fluo-4. DEET does not increase the fluorescence at the two used concentrations. (**c**) Concentration-response curves of different carbachol independent concentrations on $[Ca^{2+}]i$ increase on HEK/M3 in presence or in absence of DEET (10^{-8}M or 10^{-5}M). The peak response of $[Ca^{2+}]i$ induced by each agonist concentration is normalized in fold (F/F0). Each dot in the curve represents the mean ± SEM of three to six independent experiments. *$p < 0.05$ compared to control (ANOVA). (**d**) Modulation of the Ca^{2+} response in HEK/M3 induced by EC_{50} of carbachol (10^{-8}M) *versus* the concentration of DEET. This response is increased for 10^{-8}M of DEET. (**e**) M3 backbone is represented in red ribbon. Red balls correspond to oxygen atoms and blue ones to nitrogen. Carbon atoms are in yellow for DEET docked into the orthosteric site and in green for DEET docked into the allosteric site. (**f**) DEET in the putative allosteric site. Carbon atoms are in white for the protein and green for DEET; nitrogen are in blue, oxygen in red, sulfur in yellow and hydrogen in cyan. DEET is displayed in ball and stick fashion and residues of M3 interacting directly with DEET are highlighted in stick fashion. Dash yellow lines correspond hydrogen bonds.

was performed to confirm that DEET does not act on the orthosteric site of M3 receptor. As shown in Table 3, for concentrations ranging from 10^{-11}M to 10^{-4}M, DEET was not able to displace ^{3}[H] 4-DAMP on M3 receptor.

CC BY NC ND

Concentration of DEET (M)	10^{-11}	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
% of control specific binding	104.3	106.4	104.7	102.1	106.6	113.5	112.2	114.4

Table 3. Binding assay of DEET on human muscarinic M3 receptor. Results are from CEREP manufactory and are expressed at mean of the % of control specific binding of one duplicate.

Discussion

Epidemiological studies report different side effects of the use of DEET including neurologic side effects[37], seizures[38] and cancer[6,39], the last of which is a pathophysiological situation in which angiogenesis plays an important role[40]. Angiogenesis is critical for tumor development, and it is considered as a pre-requisite for the rapid expansion of tumor cells associated with formation of macroscopic tumors[16]. In the present study, we demonstrate that DEET acts directly on the endothelial cells to promote cellular processes leading to *in vitro* angiogenesis. Furthermore, we reveal that DEET is able to favor *in vivo* tumor growth through an enhancement of neovascularization without inducing U87MG glioblastoma-astrocytoma cell proliferation. In endothelial cells, DEET activates different steps leading to angiogenesis including migration and adhesion associated with phosphorylation of FAK, enhanced expression of VEGF and activation of NO pathway by a mechanism sensitive to pharmacological blocker or silencing of M3 receptor. Importantly, by using calcium signaling, binding and docking assays, this study highlights a mechanism underlying effects of DEET *via* an allosteric modulation of M3 receptor.

A correlation has been established between plasma levels of DEET (10^{-5}M)[23] and the risk of developing cancer[39]. Furthermore, regular use of DEET as a mosquito repellent has resulted in this molecule being present in the air, rain and rivers[41,42]. As a consequence, concentrations of DEET as high as 10^{-8}M[24] have been observed in drinking water. Once introduced in the blood circulation, DEET can remain for an extended period of time which implicates EC to be one of the primary targets of the toxicity of these compounds. Thus, to assess the impact of these concentrations on angiogenic processes, the present study has been performed using the maximum concentration found in surface water and wastewater and the maximum plasma concentrations[42].

Because U87MG tumor epithelial cells are classically used as an experimental model of glioblastoma to investigate tumor angiogenesis *in vivo*[43–45], the tumor properties of DEET have been assessed on this model. We found that DEET does not induce U87MG tumor cell proliferation whereas it favors proliferation, migration and adhesion of endothelial cells. Furthermore, according to immunostaining data, the present study confirms that DEET increases tumor promotion by enhancing neovascularization. Indeed, we report pro-angiogenic properties through *in vitro* studies in which DEET enhances FAK phosphorylation and induces the formation of stress fibers. These findings suggest that DEET plays a significant role in migration and adhesion of endothelial cells. These effects are associated with an increase of NO production and VEGF expression, two cellular mediators playing an essential role in the regulation of angiogenesis[16,46]. VEGF is a key growth factor that is highly upregulated in tumors and controls anarchic neovascularization[47]. In the present study, we reported that DEET-induced VEGF overexpression is dependent on activation of M3 muscarinic receptors. Because VEGFR-2 is the main VEGF receptor involved in cellular processes leading to *in vitro* angiogenesis[48], we suggest that cellular processes involved in DEET-induced angiogenesis are consequences of VEGF induction rather than additional effects.

The molecular targets of DEET in insects that explain its repellent activity are still debated. Potential mechanisms are inhibition of acetylcholinesterase (AChE)[8], modulation of muscarinic receptors[49] or the well-conserved ionotropic receptor Ir40a, odorant receptors (OR) and gustatory receptors (GR)[7,50–54]. Among these targets, it has been reported that some inhibitors of human AChE, like donepezil, rivastigmine or galantamine have pro-angiogenic properties in *in vitro* HUVEC cultured on ECMgel like in chick chorioallantoic membrane and/or in an ischemic hind limb model[14,55].

In the present study, we reveal that both concentrations of DEET (10^{-8}M and 10^{-5}M) significantly inhibited endothelial AChE activity, as has been demonstrated by Corbel *et al.*[8]. Inhibitors of AChE and acetylcholine itself can promote *in vitro* angiogenesis through an atropine-sensitive mechanism[14]. Moreover, it has recently been reported that HUVEC possess an autocrine non-neuronal cholinergic system involved in the regulation of angiogenesis[15]. Thus, in the present study, we show that the ability of DEET to increase angiogenic processes *in vitro* and *in vivo* was abrogated after pharmacological blockade or silencing of the M3 receptor. These results could explain the pro-angiogenic effect of DEET at both concentrations.

Indeed, although the M3 muscarinic receptor is expressed in the nervous system[56], it is now known that this cholinergic receptor is also expressed in several non-innervated tissues such as endothelial[10] or tumor cells, as well as human U87MG glioblastoma cells[57]. Interestingly, up-regulation of tumor neovascularization by DEET is significantly prevented by pFHHSiD. These results are partly explained by the analysis of both tumor MVD and area of capillaries, which show a decrement in the number of vessels in tumors treated simultaneously by DEET and pFHHSiD. These findings confirm previous studies performed on lung and colon cancer cells that expressed a cholinergic autocrine loop. In these cellular models, acetylcholine secreted by cancer cells or neighboring cells interacts with M3 muscarinic receptors to stimulate tumor growth[58] by increasing angiogenesis.

MVD may reflect the degree of angiogenesis in solid tumors. The present study reports that DEET increased MVD through a pFHHSiD sensitive pathway but in a non-significant manner. Microvessel growth is anarchic in solid tumors, producing disorganized and tortuous vessels that can vary in size[59]. Moreover, depending on the maturity of blood vessels, their spatial heterogeneity and their inner diameter, MVD does not systematically correlate with functional vascularity. Thus, the quality of MV must be also appreciated by the area of vessels that reflect their diameter, as described in the present work.

CC BY NC ND

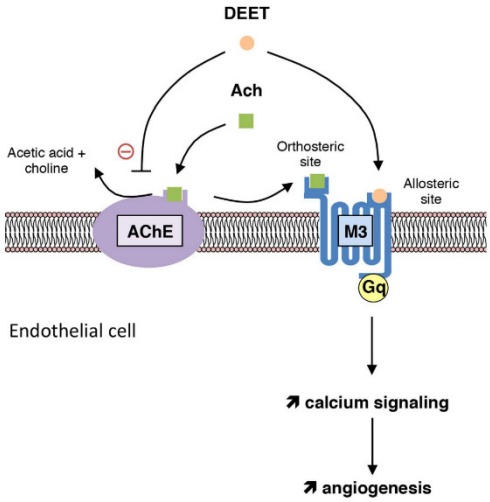


Figure 5. Summary of the DEET-induced angiogenesis mechanism. DEET inhibits AChE, the enzyme responsible for the degradation of acetylcholine in choline and acetic acid, and binds an allosteric site of M3 leading to activation of angiogenic process.

Additionally, angiogenesis processes involve endothelial cell activation as depicted by increases in intracellular calcium[34,35]. Due to a heterogeneity of carbachol-induced Ca^{2+} response in endothelial cell[36], the effects of DEET on carbachol-induced calcium signaling were evaluated in HEK/M3. In the present study, we report that DEET is not able to increase cytosolic calcium both in HUVEC and HEK/M3 cell lines at the two used concentrations, but it induces a leftward shift of the calcium response induced by carbachol on HEK/M3. These data lead us to hypothesize that DEET behaves as an allosteric modulator of M3 receptor.

The docking model of the M3 receptor used in the present study defined both orthosteric and allosteric sites. The values of the calculated affinity of DEET at both sites were not discriminative. Therefore we cannot rule out that DEET may bind to M3 at both sites or preferably on one of the two sites. DEET may thus have more than one interaction mode with M3, certainly depending on its concentration. Other works by Kruse *et al.*[32] on the M2 receptor and the simulation performed by Abd-Ella *et al.*[49] on M1/M3 receptors did support the existence of an allosteric site in human M3 receptor. At low concentration (10^{-8} M), DEET interacts with high affinity with M1/M3 mAChR allosteric sites, whereas at high concentration ($>10^{-6}$ M), DEET interacts with a very low affinity[49].

To discard the hypothesis that DEET acts directly on the orthosteric site of M3 receptor to mediate its effect, a binding assay between DEET and M3 receptor was performed. DEET is not able to displace the binding of the labeled specific M3 receptor antagonist ^{3}[H] 4-DAMP. Altogether, the most likely hypothesis is that DEET acts as an allosteric modulator of the M3 receptor allowing the potentiating effect on calcium signaling on endothelial cells and consequently angiogenesis (*in vitro* and *in vivo*) and tumor growth *in vivo*.

DEET inhibits AChE, thereby increasing acetylcholine bioavailability and binding to its M3 receptor, while strengthening proangiogenic effects by an allosteric modulation (Fig. 5).

Altogether, these data suggest pro-angiogenic properties of DEET in human health. More importantly and for the first time, these data show that an allosteric modulator of M3 muscarinic receptor subtype can promote both *in vitro* and *in vivo* angiogenesis. Considering the environmental pollution induced by DEET worldwide and its presence in drinking water sources, new water treatment technologies are needed for its elimination. Finally, risk assessment of DEET should now be implemented in humans in order to provide safe conditions of use of this insect repellent.

References

1. Fradin, M. S. & Day, J. F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N Engl J Med* **347,** 13–18, doi: 10.1056/NEJMoa011699 (2002).
2. Sudakin, D. L. & Trevathan, W. R. DEET: a review and update of safety and risk in the general population. *J Toxicol Clin Toxicol* **41,** 831–839 (2003).
3. Abou-Donia, M. B., Wilmarth, K. R., Jensen, K. F., Oehme, F. W. & Kurt, T. L. Neurotoxicity resulting from coexposure to pyridostigmine bromide, deet, and permethrin: implications of Gulf War chemical exposures. *J Toxicol Environ Health* **48,** 35–56, doi: 10.1080/009841096161456 (1996).
4. Parihar, V. K., Hattiangady, B., Shuai, B. & Shetty, A. K. Mood and memory deficits in a model of Gulf War illness are linked with reduced neurogenesis, partial neuron loss, and mild inflammation in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology* **38,** 2348–2362, doi: 10.1038/npp.2013.158 (2013).
5. Tisch, M., Schmezer, P., Faulde, M., Groh, A. & Maier, H. Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **259,** 150–153 (2002).

CC BY NC ND

6. Pahwa, P. *et al.* Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, soft tissue sarcomas, insect repellents, and phenoxyherbicides. *J Occup Environ Med* **48,** 264–274, doi: 10.1097/01.jom.0000183539.20100.06 (2006).
7. Kain, P. *et al.* Odour receptors and neurons for DEET and new insect repellents. *Nature* **502,** 507–512, doi: 10.1038/nature12594 (2013).
8. Corbel, V. *et al.* Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biol* **7,** 47, doi: 10.1186/1741-7007-7-47 (2009).
9. Swale, D. R., Sun, B., Tong, F. & Bloomquist, J. R. Neurotoxicity and mode of action of N,N-diethyl-meta-toluamide (DEET). *PLoS One* **9,** e103713, doi: 10.1371/journal.pone.0103713 (2014).
10. Wessler, I., Kirkpatrick, C. J. & Racké, K. Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* **77,** 59–79 (1998).
11. Wessler, I. *et al.* Increased acetylcholine levels in skin biopsies of patients with atopic dermatitis. *Life Sci* **72,** 2169–2172 (2003).
12. Park, Y. S. & Cho, N. J. EGFR and PKC are involved in the activation of ERK1/2 and p90 RSK and the subsequent proliferation of SNU-407 colon cancer cells by muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Cell Biochem* **370,** 191–198, doi: 10.1007/s11010-012-1410-z (2012).
13. Parnell, E. A., Calleja-Macias, I. E., Kalantari, M., Grando, S. A. & Bernard, H. U. Muscarinic cholinergic signaling in cervical cancer cells affects cell motility via ERK1/2 signaling. *Life Sci* **91,** 1093–1098, doi: 10.1016/j.lfs.2012.02.020 (2012).
14. Kakinuma, Y. *et al.* Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *J Mol Cell Cardiol* **48,** 680–693, doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.010 (2010).
15. Dhein, S. *et al.* Autocrine control of angiogenesis by endogenous acetylcholine in an *in vitro* model using human endothelial cells: evidence for an autocrine cholinergic system in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **65,** 508–515, doi: 10.1097/fjc.0000000000000221 (2015).
16. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438,** 932–936, doi: 10.1038/nature04478 (2005).
17. Hua, N. *et al.* A novel muscarinic antagonist R2HBJJ inhibits non-small cell lung cancer cell growth and arrests the cell cycle in G0/G1. *PLoS One* **7,** e53170, doi: 10.1371/journal.pone.0053170 (2012).
18. Song, P. *et al.* Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res* **63,** 214–221 (2003).
19. Peng, Z., Heath, J., Drachenberg, C., Raufman, J. P. & Xie, G. Cholinergic muscarinic receptor activation augments murine intestinal epithelial cell proliferation and tumorigenesis. *BMC Cancer* **13,** 204, doi: 10.1186/1471-2407-13-204 (2013).
20. Wu, J. *et al.* High expression of M3 muscarinic acetylcholine receptor is a novel biomarker of poor prognostic in patients with non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* **34,** 3939–44, doi: 10.1007/s13277-013-0982-x (2013).
21. Rimmaudo, L. E., de la Torre, E., Sacerdote de Lustig, E. & Sales, M. E. Muscarinic receptors are involved in LMM3 tumor cells proliferation and angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **334,** 1359–1364, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.031 (2005).
22. Español, A. J., de la Torre, E., Fiszman, G. L. & Sales, M. E. Role of non-neuronal cholinergic system in breast cancer progression. *Life Sci* **80,** 2281–2285, doi: 10.1016/j.lfs.2006.12.017 (2007).
23. Taylor, W. G., Danielson, T. J., Spooner, R. W. & Golsteyn, L. R. Pharmacokinetic assessment of the dermal absorption of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) in cattle. *Drug Metab Dispos* **22,** 106–112 (1994).
24. Aronson, D., Weeks, J., Meylan, B., Guiney, P. D. & Howard, P. H. Environmental release, environmental concentrations, and ecological risk of N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET). *Integr Environ Assess Manag* **8,** 135–166, doi: 10.1002/ieam.271 (2012).
25. Eglen, R. M., Cornett, C. M. & Whiting, R. L. Interaction of p-F-HHSiD (p-Fluoro-hexahydrosila-difenidol) at muscarinic receptors in guinea-pig trachea. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **342,** 394–399 (1990).
26. Kobayashi, M., Inoue, K., Warabi, E., Minami, T. & Kodama, T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* **12,** 138–142, doi: JST.JSTAGE/jat/12.138 [pii] (2005).
27. Tovey, S. C. & Willars, G. B. Single-cell imaging of intracellular Ca^{2+} and phospholipase C activity reveals that RGS 2, 3 and 4 differentially regulate signaling via the Galphaq/11-linked muscarinic M3 receptor. *Mol Pharmacol* **66,** 1453–64 (2004).
28. Ellman, G. L. & Callaway, E. Erythrocyte cholinesterase-levels in mental patients. *Nature* **192,** 1216 (1961).
29. Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22,** 4673–4680 (1994).
30. Spitzer, R. & Jain, A. N. Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application. *J Comput Aided Mol Des* **26,** 687–699, doi: 10.1007/s10822-011-9533-y (2012).
31. Kruse, A. C. *et al.* Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **482,** 552–556, doi: 10.1038/nature10867 (2012).
32. Kruse, A. C. *et al.* Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **504,** 101–106, doi: 10.1038/nature12735 (2013).
33. Mazzone, M. & Carmeliet, P. Drug discovery: a lifeline for suffocating tissues. *Nature* **453,** 1194–1195, doi: 10.1038/4531194a (2008).
34. Munaron, L. & Fiorio Pla, A. Endothelial calcium machinery and angiogenesis: understanding physiology to interfere with pathology. *Curr Med Chem* **16,** 4691–4703 (2009).
35. Munaron, L. & Scianna, M. Multilevel complexity of calcium signaling: Modeling angiogenesis. *World J Biol Chem* **3,** 121–126, doi: 10.4331/wjbc.v3.i6.121 (2012).
36. Boittin, F. X. *et al.* Connexins and M3 muscarinic receptors contribute to heterogeneous Ca(2+) signaling in mouse aortic endothelium. *Cell Physiol Biochem* **31,** 166–178, doi: 10.1159/000343358 (2013).
37. Haley, R. W. & Kurt, T. L. Self-reported exposure to neurotoxic chemical combinations in the Gulf War. A cross-sectional epidemiologic study. *Jama* **277,** 231–237 (1997).
38. Lipscomb, J. W., Kramer, J. E. & Leikin, J. B. Seizure following brief exposure to the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide. *Ann Emerg Med* **21,** 315–317 (1992).
39. Hardell, L., Näsman, A., Ohlson, C. G. & Fredrikson, M. Case-control study on risk factors for testicular cancer. *Int J Oncol* **13,** 1299–1303 (1998).
40. Hillon, P., Guiu, B., Vincent, J. & Petit, J. M. Obesity, type 2 diabetes and risk of digestive cancer. *Gastroenterol Clin Biol* **34,** 529–533, doi: 10.1016/j.gcb.2010.07.021 (2010).
41. Loos, R. *et al.* Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res* **44,** 4115–4126, doi: 10.1016/j.watres.2010.05.032 (2010).
42. Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E. & Hart, A. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Sci Total Environ* **416,** 1–21, doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.072 (2012).
43. Jarzabek, M. A. *et al.* Interrogation of gossypol therapy in glioblastoma implementing cell line and patient-derived tumour models. *Br J Cancer* **111,** 2275–2286, doi: 10.1038/bjc.2014.529 (2014).
44. Hu, P. *et al.* AcSDKP regulates cell proliferation through the PI3KCA/Akt signaling pathway. *PLoS One* **8,** e79321, doi: 10.1371/journal.pone.0079321 (2013).
45. Hueng, D. Y. *et al.* Inhibition of Nodal suppresses angiogenesis and growth of human gliomas. *J Neurooncol* **104,** 21–31, doi: 10.1007/s11060-010-0467-3 (2011).
46. Radisavljevic, Z., Avraham, H. & Avraham, S. Vascular endothelial growth factor up-regulates ICAM-1 expression via the phosphatidylinositol 3 OH-kinase/AKT/Nitric oxide pathway and modulates migration of brain microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **275,** 20770–20774, doi: 10.1074/jbc.M002448200 (2000).

CC BY NC ND

47. Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S. & Carmeliet, P. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J Clin Invest* **123,** 3190–3200, doi: 10.1172/JCI70212 (2013).
48. Keyt, B. A. *et al.* Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **271,** 5638–5646 (1996).
49. Abd-Ella, A. *et al.* The repellent DEET potentiates carbamate effects via insect muscarinic receptor interactions: An alternative strategy to control insect vector-Borne diseases. *PLoS One* **10,** e0126406 doi: 10.1371/journal.pone.0126406 (2015).
50. Tsitoura, P., Koussis, K. & Iatrou, K. Inhibition of Anopheles gambiae odorant receptor function by mosquito repellents. *J Biol Chem* **290,** 7961–7972, doi: 10.1074/jbc.M114.632299 (2015).
51. Leal, W. S. The enigmatic reception of DEET - the gold standard of insect repellents. *Curr Opin Insect Sci* **6,** 93–98, doi: 10.1016/j.cois.2014.10.007 (2014).
52. Xu, P., Choo, Y. M., De La Rosa, A. & Leal, W. S. Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. *Proc Natl Acad Sci USA* **111,** 16592–16597, doi:10.1073/pnas.1417244111 (2014).
53. DeGennaro, M. *et al.* orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature* **498,** 487–491, doi: 10.1038/nature12206 (2013).
54. Lee, Y., Kim, S. H. & Montell, C. Avoiding DEET through insect gustatory receptors. *Neuron* **67,** 555–561, doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.006 (2010).
55. Mortazavian, S. M. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitors promote angiogenesis in chick chorioallantoic membrane and inhibit apoptosis of endothelial cells. *Int J Alzheimers Dis* **2013,** 121068, doi: 10.1155/2013/121068 (2013).
56. Caulfield, M. P. & Birdsall, N. J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50,** 279–290 (1998).
57. Kuhn, S. A. *et al.* Glioblastoma cells express functional cell membrane receptors activated by daily used medical drugs. *J Cancer Res Clin Oncol* **135,** 1729–1745, doi: 10.1007/s00432-009-0620-6 (2009).
58. Spindel, E. R. Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cancer. *Handb Exp Pharmacol* 451–468, doi: 10.1007/978-3-642-23274-9_19 (2012).
59. Yamamura, T., Tsukikawa, S., Yamada, K. & Yamaguchi, S. Morphologic analysis of microvessels in colorectal tumors with respect to the formation of liver metastases. *J Surg Oncol* **78,** 259–264 (2001).

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Gary Willars (Department of Cell Physiology and Pharmacology, University of Leicester, United Kingdom) and also Pr Catherine Passirani and Dr Anne Clavreul (UMR 1066 Inserm, France) for their generous gifts of HEK/M3 and U87MG cell line, respectively. They also wish to thank Dr Jérémie Riou (UMR 1066 Inserm, France) for his kind help in statistical analysis and Isabelle Brunois Debu and Jessica Faulkner for the reading of this manuscript.

Author Contributions

S.L. performed the experiments, acquired and analyzed data, interpreting and discussed the results, realized all the figures, wrote and revised the manuscript; N.C. performed the experiments, acquired and analyzed data, interpreting and discussed the results, wrote and revised the manuscript, conceived and designed the experiments; G.H. performed the experiments, acquired and analyzed data; Q.-T.D. performed the experiments; P.B. conceived and designed the experiments; acquired and analyzed data; J.-F.Q. performed the experiments, acquired and analyzed data, interpreting and discussed the results; V.A.-M. performed the experiments, acquired and analyzed data; B.L. interpreting and discussed the results, wrote and revised the manuscript; S.F. interpreting and discussed the results, wrote and revised the manuscript, conceived and designed the experiments.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at http://www.nature.com/srep

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Legeay, S. *et al.* The insect repellent *N*,*N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) induces angiogenesis *via* allosteric modulation of M3 muscarinic receptor in endothelial cells. *Sci. Rep.* **6**, 28546; doi: 10.1038/srep28546 (2016).

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

BY NC ND

CC BY NC ND

ANNEXE 2 : Informations supplémentaires

The insect repellent *N,N*-diethyl-*m*-toluamide (DEET) induces angiogenesis *via* allosteric modulation of M3 muscarinic receptor in endothelial cells

Samuel Legeay[1], Nicolas Clere[1], Grégory Hilairet[1], Quoc-Tuan Do[2], Philippe Bernard[2], Jean-François Quignard[3], Véronique Apaire-Marchais[4], Bruno Lapied[4], Sébastien Faure[1].

[1]Inserm U1063 - Stress oxydant et pathologies métaboliques, LUNAM Université, Angers, France

[2]GreenPharma S.A.S. 3 allée du titane, 45100 Orléans, France.

[3]Inserm U1045 - Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Université de Bordeaux, France.

[4]Laboratoire des Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES-EA 2647, USC INRA 1330, Angers, France.

Address for correspondence:
Sébastien Faure, PharmD, PhD
UMR INSERM 1063 – Université d'Angers
Institut de biologie en santé
Rue des Capucins
49045 Angers Cedex
France
sebastien.faure@univ-angers.fr
Tel: +33 2 41 22 67 40

CC BY NC ND

Supplementary data

Figure S1. DEET does not modify proliferation of B16F10 melanoma cell line

CyQUANT® assay reveals that both concentrations of DEET (10^{-8} M and 10^{-5} M) do not increase proliferation of B16F10 cell line. Results are expressed at mean ± SEM ; *p< 0.05 compared to control (Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test).

Figure S2. DEET does not induce neither cytotoxicity nor apoptosis in HUVEC

(a) *In vitro* cell viability was assessed by colorimetric analysis of MTT reduction after a treatment with 10^{-8} M or 10^{-5} M DEET for 24 h. (b) Flow cytometric DNA content histograms (fluorescence in arbitrary units, AU) of HUVEC exposed to 10^{-8} or 10^{-5} M DEET for 24 h, show that DEET does not induce apoptosis. Actinomycin D (10^{-6} M) was used as positive control. *p<0.05; **p<0.01 compared to control (Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test).

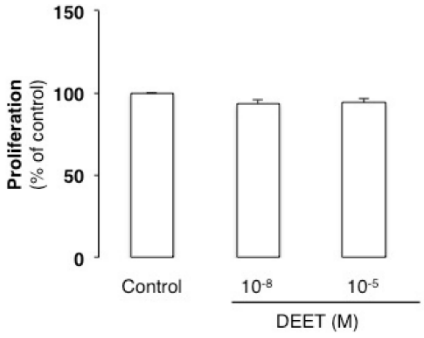
Figure S3. *In vitro* capillary formation at increasing concentrations of DEET

HUVEC were cultured on ECMgel® and treated for 24h with concentrations ranging from 10^{-14} M to 10^{-5} M DEET. 10^{-8}M DEET allows reaching the plateau of capillaries formation. Reproducible data are obtained from five to six independent experiments. *p<0.05; ***p<0.001 compared to control (Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison test).

Figure S4. Sequence alignment of rat and human M3 receptor

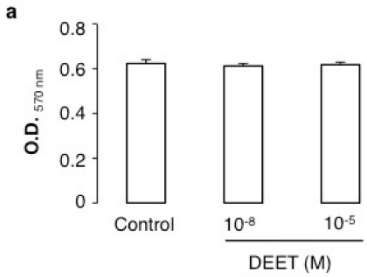
CC BY NC ND

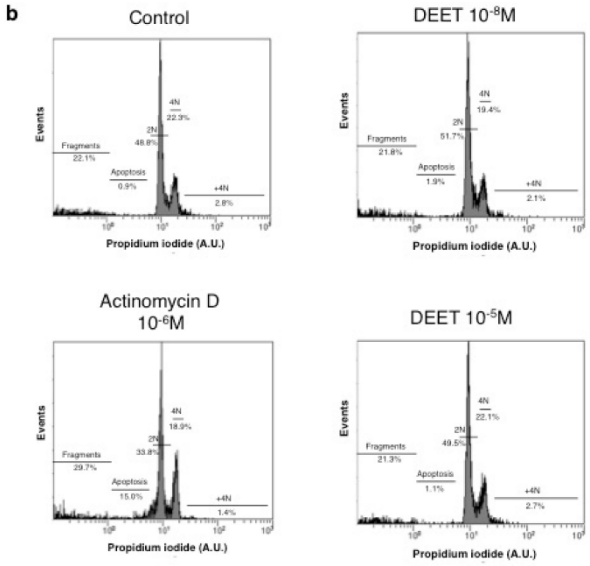
Supplemental data
Figure S1



CC BY NC ND

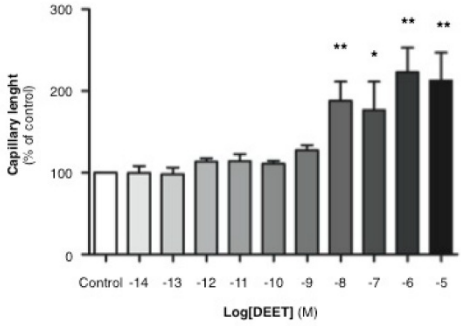
Supplemental data
Figure S2





CC BY NC ND

Supplemental data
Figure S3



BY NC ND

Supplemental data
Figure S4

```
ACM3_HUMAN    MTLHNNSTTSPLFPNISSSWIHSPSDAGLPPGTVTHFGSYNVSRAAGNFSSPDGTTDDPL
ACM3_RAT      MTLHSNSTTSPLFPNISSSWVHSPSEAGLPLGTVTQLGSYNISQETGNFSSND-TSSDPL
              ****.***************:****:**** ****::****:*: :***** * *:.***
Prim.cons.    MTLH2NSTTSPLFPNISSSW2HSPS2AGLP2GTVT22GSYN2S222GNFSS2DGT22DPL

                       70        80        90       100       110       120
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    GGHTVWQVVFIAFLTGILALVTIIGNILVIVSFKVNKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVI
ACM3_RAT      GGHTIWQVVFIAFLTGFLALVTIIGNILVIVAFKVNKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVI
              ****:***********:**************:**********************************
Prim.cons.    GGHT2WQVVFIAFLTG2LALVTIIGNILVIV2FKVNKQLKTVNNYFLLSLACADLIIGVI

                      130       140       150       160       170       180
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    SMNLFTTYIIMNRWALGNLACDLWLAIDYVASNASVMNLLVISFDRYFSITRPLTYRAKR
ACM3_RAT      SMNLFTTYIIMNRWALGNLACDLWLSIDYVASNASVMNLLVISFDRYFSITRPLTYRAKR
              **************************:***********************************
Prim.cons.    SMNLFTTYIIMNRWALGNLACDLWL2IDYVASNASVMNLLVISFDRYFSITRPLTYRAKR

                      190       200       210       220       230       240
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    TTKRAGVMIGLAWVISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAIAAF
ACM3_RAT      TTKRAGVMIGLAWVISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAIAAF
              ************************************************************
Prim.cons.    TTKRAGVMIGLAWVISFVLWAPAILFWQYFVGKRTVPPGECFIQFLSEPTITFGTAIAAF

                      250       260       270       280       290       300
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    YMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAETENFVHPTGSSRSCSSYELQQQSM
ACM3_RAT      YMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAEAENFVHPTGSSRSCSSYELQQQGV
              ************************************:*********************.:
Prim.cons.    YMPVTIMTILYWRIYKETEKRTKELAGLQASGTEAE2ENFVHPTGSSRSCSSYELQQQ22

                      310       320       330       340       350       360
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    KRSNRRKYGRCHFWFTTKSWKPSSEQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSE
ACM3_RAT      KRSSRRKYGRCHFWFTTKSWKPSAEQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSE
              ***.******************:**********************************
Prim.cons.    KRS2RRKYGRCHFWFTTKSWKPS2EQMDQDHSSSDSWNNNDAAASLENSASSDEEDIGSE

                      370       380       390       400       410       420
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    TRAIYSIVLKLPGHSTILNSTKLPSSDNLQVPEEELGMVDLERKADKLQAQKSVDDGGSF
ACM3_RAT      TRAIYSIVLKLPGHSSILNSTKLPSSDNLQVSNEDLGTVDVERNAHKLQAQKSMGDGDNC
              ***************:***************.:*:** **:**:*.*******:.**..
Prim.cons.    TRAIYSIVLKLPGHS2ILNSTKLPSSDNLQV22E2LG2VD2ER2A2KLQAQKS22DG222

                      430       440       450       460       470       480
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    PKSFSKLPIQLESAVDTAKTSDVNSSVGKSTATLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKR
ACM3_RAT      QKDFTKLPIQLESAVDTGKTSDTNSSADKTTATLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKR
               *.:;************.****.***..:*******************************
Prim.cons.    2K2F2KLPIQLESAVDT2KTSD2NSS22K2TATLPLSFKEATLAKRFALKTRSQITKRKR

                      490       500       510       520       530       540
                        |         |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    MSLVKEKKAAQTLSAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFCDSCIPKTFWNLGYWLCYINSTVN
ACM3_RAT      MSLIKEKKAAQTLSAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFCDSCIPKTYWNLGYWLCYINSTVN
              ***:**************************************:***************
Prim.cons.    MSL2KEKKAAQTLSAILLAFIITWTPYNIMVLVNTFCDSCIPKT2WNLGYWLCYINSTVN

                      550       560       570       580       590
                        |         |         |         |         |
ACM3_HUMAN    PVCYALCNKTFRTTFKMLLLCQCDKKRRKQQYQQRQSVIFHKRAPEQAL
ACM3_RAT      PVCYALCNKTFRTTFKTLLLCQCDKRRRKQQYQQRQSVIFHKRVPEQAL
              **************** ********:******************.*****
Prim.cons.    PVCYALCNKTFRTTFK2LLLCQCDK2KRRKQQYQQRQSVIFHKR2PEQAL
```

Alignment data :
Alignment length : 590
Identity (*) : 541 is 91.69 %
Strongly similar (:) : 26 is 4.41 %
Weakly similar (.) : 15 is 2.54 %
Different : 8 is 1.36 %
Sequence 0001 : ACM3_HUMAN (590 residues).
Sequence 0002 : ACM3_RAT (589 residues).

BY NC ND

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

université angers

Thèse de Doctorat

Samuel LEGEAY

Physiopathologie de l'endothélium : Applications à l'angiogenèse induite par les répulsifs anti-moustiques à base de DEET et à la dysfonction endothéliale dans le cadre du diabète de type 1

Pathophysiology of the endothelium: Application on angiogenesis induced by DEET-based mosquito repellents and type 1 diabetes-induced endothelial dysfunction

Résumé

L'endothélium est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques tels que les phénomènes d'inflammation, d'angiogenèse, de prolifération de cellules musculaires lisses et du métabolisme de nombreux médiateurs notamment hormonaux. Ces travaux de thèse avaient pour objectif d'étudier l'endothélium sous deux aspects pouvant conduire à des pathologies : l'angiogenèse et la dysfonction endothéliale. La première étude a permis de mettre en évidence un effet pro-angiogénique *in vitro* et *in vivo* du DEET, un répulsif anti-moustiques. Cet effet était associé à une augmentation de la production du monoxyde d'azote (NO), de la phosphorylation de la *focal adhesion kinase* (FAK) et de l'expression du *vascular endothelium growth factor* (VEGF) et conduit, *in fine*, à une augmentation de la croissance tumorale sur un modèle de xénogreffe de tumeur chez la souris. De plus, ces travaux ont montré que l'effet du DEET était engendré au niveau endothélial par une activité inhibitrice sur l'acétylcholinestérase ainsi que par une modulation allostérique du récepteur muscarinique M3. La deuxième partie consistait à étudier le rôle du stress du réticulum endoplasmique et de la *protein-tyrosine phosphatase 1B* (PTP1B), une enzyme régulant négativement la voie de l'insuline, dans la dysfonction endothéliale induite par le diabète de type 1 (DT1). Les résultats ont permis d'identifier PTP1B comme une cible potentielle pour le traitement de la dysfonction endothéliale dans le cadre du DT1. L'ensemble de ces travaux de thèse permet une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'endothélium et par conséquent fournit des connaissances supplémentaires pour la prise en charge de pathologies impliquant l'endothélium.

Mots clés

Angiogenèse, DEET, dysfonction endothéliale, diabète de type 1, PTP1B, stress du réticulum

Abstract

The endothelium is involved in plenty physiological and pathophysiological process as inflammation, angiogenesis, smooth muscle cell proliferation and metabolism and catabolism of mediators like hormones. The aim of this work was to study the endothelium from two ways: angiogenesis and endothelial dysfunction. Firstly, we evidenced a pro-angiogenic effect *in vitro* and *in vivo* of DEET, a mosquito repellent. This effect was associated with an increase of NO production, focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression leading to an increase of tumor growth in a mouse-xenograft model. In addition, we showed that the effect of DEET was due to both inhibition of the endothelial acetylcholinesterase and allosteric modulation of the muscarinic type 3 receptor (M3). Secondly, we studied the role of the endoplasmic reticulum stress and the protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) in the type 1 diabetes (T1D)-induced endothelial dysfunction. Results allowed us to identify PTP1B as a potential target for the treatment of the endothelial dysfunction in the context of T1D. All these data supply a better understanding of the pathophysiology of the endothelium and consequently provide additional information for the management of pathologies involving endothelium.

Key Words

Angiogenesis, DEET, endothelial dysfunction, type 1 diabetes, PTP1B, endoplasmic reticulum stress

CC BY NC ND

L'université Bretagne Loire