



HAL
open science

Caractérisation moléculaire et pharmacologique des récepteurs nicotiques neuronaux chez la tique *Ixodes ricinus*

Anaïs Le Mauff

► **To cite this version:**

Anaïs Le Mauff. Caractérisation moléculaire et pharmacologique des récepteurs nicotiques neuronaux chez la tique *Ixodes ricinus*. Zoologie des invertébrés. Université d'Orléans, 2021. Français. NNT: 2021ORLE3150 . tel-03700341

HAL Id: tel-03700341

<https://theses.hal.science/tel-03700341v1>

Submitted on 21 Jun 2022

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.

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT

Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures

THÈSE présentée par :

Anaïs LE MAUFF

Soutenue le : 17 novembre 2021

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Neurobiologie

Caractérisation moléculaire et pharmacologique des
récepteurs nicotiques neuronaux chez la tique
Ixodes ricinus.

THÈSE dirigée par :

Pr. **THANY H. Steeve**

Professeur, Université d'Orléans, France

RAPPORTEURS :

Dr. **SIMÔ Ladislav**

Dr. **SWALE Daniel**

Chargé de recherche, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, France

Professeur associé, Université d'Etat de Louisiane, Etats-Unis

JURY :

Pr. **MORTAUD Stéphane**

Dr. **BELZUNCES Luc**

Dr. **SIMÔ Ladislav**

Dr. **SWALE Daniel**

Dr. **TAILLEBOIS Emiliane**

Pr. **THANY H. Steeve**

Professeur, CNRS d'Orléans, France

Directeur de recherche, INRAe d'Avignon, France

Chargé de recherche, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, France

Professeur associé, Université d'Etat de Louisiane, Etats-Unis

Maître de Conférences, Université d'Orléans, France

Professeur, Université d'Orléans, France

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon encadrant de thèse, **Steeve H. Thany**, qui a cru en moi, a été disponible et m'a permis de me développer professionnellement et personnellement pendant ces trois années de thèse. Merci de m'avoir fait confiance car à l'issue de ma thèse, je peux me projeter pour espérer travailler à l'étranger afin de développer et d'appliquer les compétences acquises durant mon doctorat. Je remercie également la **Direction Générale de l'Armement (DGA)** et l'**Agence de l'Innovation et de la Défense (AID)** pour m'avoir fait confiance en finançant entièrement ma thèse, particulièrement Mme **Emmanuelle Guillot-Combe** et Mme **Laurence Anglade**.

Je remercie les membres de mon jury de thèse **Daniel Swale** (Associate Professor, Louisiana State University) et **Ladislav Simo** (Chargé de recherche, ENV de Maison Alfort) pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit de thèse. Merci à **Stéphane Mortaud** (Professeur des Universités, CNRS d'Orléans) et **Luc Belzunces** (Directeur de recherche, INRAe d'Avignon) de faire également partie des membres du jury.

Merci à l'équipe Entomologie et Biologie Intégrée :

Alison Cartereau, je n'oublierais jamais ton accueil au sein de l'équipe, si motivant. Tu m'as tout appris en électrophysiologie, à prendre soin des petits œufs et à rester zen pendant leur manipulation. Nos nombreuses discussions à propos de tout mais surtout de n'importe quoi ont permis de développer une complicité qui va me manquer. Merci à **Emiliane Taillebois** pour m'avoir coaché en biologie moléculaire, avoir écouté mes questions et mes problèmes rencontrés pendant toutes ces manipulations. **Carine Martin**, merci pour ta présence dès le début de ma thèse, d'avoir été là pour m'aider, pour ton soutien, ta bonne humeur et les petits réconforts sucrés. De même **Xavier Pineau**, tu m'as permis de me changer les idées grâce aux séances de sport après le travail (fatigantes mais nécessaires pour le moral), grâce à toi j'ai également découvert une addiction pour les élevages de petites bêtes ! **Aurélien Sallé**, **Stéphanie Bankhead**, **Mathilde Baude** et **Daniel Auguin** pour votre présence et les discussions que l'on a pu partager. Sans oublier **Jean Noël Houchat**, coéquipier de la salle 140, où nous avons pu partager de longues journées de manips mais toujours en musique et dans la bonne humeur !

Merci à tous les membres du laboratoire des Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (avant son changement de nom, #P2E) :

François Héricourt et **Françoise Chefdor**, merci beaucoup pour votre soutien, nos conversations et vos réponses à mes questions quand je faisais des blocages en biologie moléculaire.

En début de thèse, cette période lointaine où on prenait un café ensemble le matin en arrivant au laboratoire, merci à vous **Isabelle Le Jean**, **Alain Delaunay**, **Stéphane Maury** ainsi que **Laurent Leguay** pour avoir participer à ces bons débuts de journée. Également les moments partagés, les

repas du midi et les discussions simples mais ô combien intéressantes avec **Regis Fichot, Sylvain Bourgerie, Christiane Depieurreux, Cécile Barbarroux, Muriel Feinard-Duranceau, Richard Bouceffa** et **Mélanie Larcher**. **Domenico Morabito**, merci pour tes conseils culinaires et toutes les petites attentions que tu as pu faire pendant ces trois années. **Sabine Carpin**, merci beaucoup pour ton soutien, nos conversations étaient parfois intenses mais m'ont toujours donné le sourire et de la motivation. Également, pour les personnes qui font ou faisaient parties du labo mais que je n'ai pas eu la chance de beaucoup côtoyer **Florie Miard** et **Christophe Hano**.

Merci aux doctorants qui étaient là quand je suis arrivée en thèse et à ceux qui sont arrivés au cours de celle-ci, pour ces bonnes discussions autour d'un café ou en plein milieu de l'Open Space : **Mamadou Dia Sow** et **Laure Boyer**, ainsi que **Manhattan Lebrun**, également coéquipière de course à pied ainsi que pour les weekend et jours fériés au labo. Également, **Julien Vignaud, Hanae Makhokh, Yassine Chafik** et **Elodie Le Souchu**, un rayon de soleil pour cette dernière année de thèse !

Merci à toutes ces personnes rencontrées brièvement pendant ces trois ans mais avec qui j'ai pu partager de magnifiques moments au travail mais également personnellement, **Erin Maloney, Alexandra Cremades, Chadha Bouslimi, Melissa Simiele, Oriane Bellahoues** et **Robin Moom**, votre joie de vivre et votre enthousiasme m'ont beaucoup apporté.

Sans oublier mes amis qui m'ont permis de garder le moral, de me rebooster lors de ces brefs moments passés ensemble ou juste après de petits appels, des messages... **Mathilde** et **David** pour votre gentillesse et ce magnifique humour, **Mélanie** (toi qui as embarqué dans cette même galère de 3 ans mais à Rennes), **Camille** (qui m'a sûrement inspirée et aider à me convaincre que j'étais capable de réaliser une thèse), également **Dannilo, Anne Claire, Aline**, merci pour ces moments passés ensemble. Pendant ma thèse j'ai pu partager beaucoup de samedi matin avec la team des bénévoles de l'APCLO, ces sessions de douceurs en votre présence et celle des petits chats m'ont permis de m'échapper et de me détendre grandement.

Bien-sûr merci à toute ma famille, qui a toujours cru en moi, m'a toujours accompagné et soutenue. Mes parents qui m'ont soutenu depuis toujours jusqu'à maintenant, tout leur amour et leurs encouragements m'ont permis d'aller aussi loin. Je n'ai pas encore posé le pied aux îles Kerguelen mais peut-être un jour je voyagerais aussi sur le Marion Dufresne pour prendre une troupe de manchots en photo.

Et pour finir, merci à toi, avec qui je vais enfin pouvoir commencer à vivre toutes les aventures dont on parle depuis plus de 2 ans maintenant. Commencer par le Japon est vraiment une chose magnifique, j'ai hâte de partager tout cela avec toi !

Préambule

Les maladies vectorielles sont un enjeu mondial en santé publique, car elles représentent 17% des maladies infectieuses, avec plus de 1 million de décès par an, et sont transmises notamment par des arthropodes comme les moustiques et les tiques (Rapport Organisation Mondiale de la Santé, OMS 2017). De ce fait, les animaux ainsi que l'Homme peuvent être affectés par les tiques et les pathogènes qu'elles peuvent transmettre. La tique, *Ixodes ricinus* est capable de transmettre une diversité de microorganismes, comme ceux responsables de Borrélioses, de l'encéphalite à tiques ou encore de la babésiose. Sa répartition géographique s'étend largement au sein de l'hémisphère nord, et pourrait encore évoluer face au changement climatique. Il est donc nécessaire de trouver des moyens de lutte efficace contre la tique *I. ricinus* pour limiter la transmission de pathogènes et le développement de maladies humaines et animales. Les moyens de lutte utilisés majoritairement et depuis de nombreuses années dans la protection contre les tiques sont des acaricides de nature chimique qui ciblent le système nerveux. Ainsi, les pesticides sont largement utilisés au niveau des élevages pour la protection contre les tiques et une augmentation importante de la résistance face aux composés présents sur le marché est constatée.

La tique *I. ricinus* n'a jamais été utilisé au laboratoire et contrairement aux autres arthropodes comme les insectes, aucune donnée n'était disponible sur les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique présents chez cette espèce. Au cours de cette thèse, un travail important de mise au point de nouvelles techniques pour identifier les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique présents dans le synganglion de la tique a été effectué, notamment la microtransplantation de membranes (provenant de synganglia) dans des ovocytes de xénopes, le développement d'un test comportemental permettant d'étudier le potentiel répulsif de composés et enfin le clonage et la caractérisation de gènes codant pour des sous-unités de récepteurs nicotiniques du synganglion.

Par conséquent, ce travail de thèse a été divisé en plusieurs parties afin de rendre compte des différentes étapes de mon travail. Ce manuscrit débutera par une introduction générale situant la problématique des tiques. Dans le matériel et méthodes, les protocoles expérimentaux utilisés sont décrits, en les présentant dans le contexte de leur utilisation. La description des résultats est effectuée en 3 étapes. Les premiers résultats portent sur la technique de microtransplantation de préparation de membranes issues du synganglion (ou système nerveux central) de la tique afin d'étudier les propriétés pharmacologiques des récepteurs nicotiques natifs. Ensuite, nous avons débuté la caractérisation moléculaire des gènes codants pour les sous-unités de nAChRs chez la tique afin d'identifier les gènes impliqués dans la sensibilité/insensibilité vis-à-vis de composés acaricides. Parallèlement à ce travail, nous avons développé un protocole comportemental afin d'évaluer l'effet répulsif de composés qui seront développés comme futurs acaricides.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS | 1 |
| INTRODUCTION | 5 |
| CHAPITRE 1 : LES TIQUES, UN PROBLEME DE SANTE MONDIAL | 7 |
| 1 - LES TIQUES ET LEUR IMPORTANCE SUR LE PLAN MEDICAL ET VETERINAIRE | 7 |
| 2 - IDENTIFICATION, DESCRIPTION ET PHYLOGENIE | 8 |
| 3 - RECHERCHE DES HOTES | 12 |
| 4 - REPAS SANGUIN DE LA TIQUE | 13 |
| 5 - LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 14 |
| 5.1 - Anatomie générale | 14 |
| 5.2 - Les glandes salivaires | 15 |
| 5.3 - Cycle de développement | 19 |
| 5.4 - Ecosystème et répartition géographique | 21 |
| 6 - IMPACTS DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> SUR LA SANTE HUMAINE | 23 |
| 6.1 - <i>Ixodes ricinus</i> , vecteur de maladies humaines | 23 |
| 6.2 - Acquisition des pathogènes chez les tiques | 24 |
| 6.3 - Transmission des pathogènes par les tiques | 26 |
| 6.4 - Maladies diagnostiquées chez l'Homme | 27 |
| 7 - EFFETS DU CHANGEMENT CLIMATIQUE SUR L'ENVIRONNEMENT ET L'ACTIVITE DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 28 |
| 8 - EFFETS DES ACTIVITES HUMAINES SUR LE RISQUE DE RENCONTRER DES TIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT | 30 |
| CHAPITRE 2 : UTILISATION DES PESTICIDES DANS LA LUTTE CONTRE LES TIQUES | 33 |
| 1 - LUTTE CHIMIQUE POUR LA PROTECTION DES ELEVAGES | 33 |
| 2 - PROTECTION DE L'HOMME CONTRE LES TIQUES | 35 |
| 2.1 - Protection par application de répulsifs chimiques | 35 |
| 2.2 - Développement de répulsifs à base d'huiles essentielles | 37 |
| 2.3 - Développement de phénomènes de résistances | 40 |
| 3 - UTILISATION DES PESTICIDES CIBLANT LES RECEPTEURS NICOTINIQUES | 41 |
| 3.1 - Utilisation de ces composés dans la lutte contre les tiques | 41 |
| 3.2 - Néonicotinoïdes et autres composés ciblant les récepteurs nicotiniques | 42 |
| CHAPITRE 3 : LE RECEPTEUR A L'ACETYLCHOLINE DE TYPE NICOTINIQUE | 47 |
| 1 - DESCRIPTION DES NACHRS CHEZ LES VERTEBRES | 47 |
| 1.1 - Généralités sur les récepteurs canaux activés par un ligand | 47 |
| 1.2 - Découverte des récepteurs nicotiniques | 48 |
| 1.3 - Propriétés structurales et fonctionnelles des nAChRs | 50 |
| 1.4 - Diversité des récepteurs chez les vertébrés | 58 |
| 1.5 - Modulation allostérique des nAChRs | 62 |
| 2 - DIVERSITE MOLECULAIRE DES NACHRS CHEZ LES ARTHROPODES | 65 |
| 2.1 - Diversité génétique des sous-unités de nAChRs d'arthropodes | 65 |
| 2.2 - Multiplicité des sous-unités de nAChRs chez les arthropodes | 68 |

| | |
|---|----|
| 3 - CARACTERISATION PHARMACOLOGIQUE DES nACHRS CHEZ LES ARTHROPODES | 72 |
| 3.1 - Historique de l'étude électrophysiologique des nAChRs d'arthropodes | 72 |
| 3.2 - Identification de différents sous-types pharmacologiques de nAChRs chez les arthropodes | 73 |
| 3.3 - Etude des sites de liaison des récepteurs d'arthropodes | 75 |
| 4 - MODE D'ACTION DES NEONICOTINOÏDES | 77 |
| 4.1 - Activité neurotoxique des néonicotinoïdes | 77 |
| 4.2 - Etude de la sélectivité des nAChRs face aux néonicotinoïdes | 78 |
| 4.3 - Peu d'études sur l'action des néonicotinoïdes chez les arachnides | 80 |

CONTEXTE DU PROJET DE RECHERCHE **82**

MATERIEL ET METHODES **86**

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE 1 : DESCRIPTION DU SYSTEME NERVEUX DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 88 |
| 1 - PROVENANCE ET CONDITIONS DE MAINTIEN AU LABORATOIRE | 88 |
| 2 - LE SYSTEME NERVEUX DE LA TIQUE | 89 |
| 3 - DISSECTION DES TIQUES ET PRELEVEMENT DE LEUR SYNGANGLION | 90 |
| CHAPITRE 2 : ETUDE DES RECEPTEURS NATIFS PROVENANT D'EXTRAITS MEMBRANAIRES DU SYNGANGLION DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 94 |
| 1 - EXTRACTION DES PROTEINES MEMBRANAIRES DU SYNGANGLION DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 94 |
| 1.1 - Dissociation des tissus et précipitation | 94 |
| 1.2 - Gradient de sucrose et resuspension dans du tampon glycine | 95 |
| 1.3 - Quantification des protéines extraites | 96 |
| 2 - MARQUAGE DES nACHRS CONTENUS DANS LES MEMBRANES A L'AIDE D'ALPHA-BUNGAROTOXINE CONJUGUEE A L'ALEXA-488 | 97 |
| CHAPITRE 3 : CARACTERISATION PHARMACOLOGIQUE DES nACHRS NATIFS DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 100 |
| 1 - L'OVOCYTE DE XENOPE, UN SYSTEME D'EXPRESSION HETEROLOGUE | 100 |
| 2 - INJECTION DES OVOCYTES DE XENOPE | 101 |
| 3 - DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE DE DOUBLE MICROELECTRODE EN POTENTIEL IMPOSE | 102 |
| 3.1 - Principe de la technique TEVC | 102 |
| 3.2 - Etude électrophysiologique des protéines extraites des synganglia de tiques | 103 |
| 3.3 - Solutions utilisées pour la caractérisation des nAChRs natifs | 104 |
| 4 - ANALYSE DES DONNEES ET TESTS STATISTIQUES | 106 |
| CHAPITRE 4 : ETUDE DU COMPORTEMENT D'EVITEMENT CHEZ LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 108 |
| 1 - DESCRIPTION DU DISPOSITIF ET DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL | 108 |
| 2 - DESCRIPTION DU LOGICIEL TOXTRAC ET ANALYSE DES RESULTATS | 109 |
| 2.1 - Toxtrac, logiciel d'analyse de vidéo | 109 |
| 2.2 - Analyses statistiques | 110 |
| CHAPITRE 5 : CARACTERISATION MOLECULAIRE DE SOUS-UNITES DES nACHRS NEURONAUX EXPRIMES CHEZ LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 114 |
| 1 - PREPARATION DES ADNC A PARTIR DES TRANSCRITS DE SOUS-UNITES DE nACHRS EXPRIMES DANS LES SYNGANGLIA | 115 |
| 2 - AMPLIFICATION DES ORFs DE SOUS-UNITES DES nACHRS NEURONAUX DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 116 |

| | |
|--|-----|
| 2.1 - La technique d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR) | 116 |
| 2.2 - Amplification des ORFs de sous-unités des nAChRs neuronaux de la tique | 117 |
| 2.3 - Technique de la RACE PCR | 119 |
| 3 - CLONAGE DES SOUS-UNITES DE NACHRS OBTENUES PAR PCR | 122 |
| 3.1 - Purification des fragments d'ADN amplifiés | 122 |
| 3.2 - Clonage dans le vecteur pCR™2.1-TOPO® | 122 |
| 3.3 - Insertion dans le vecteur d'expression pGEM | 123 |
| 3.4 - Transformation bactérienne et criblage des clones obtenus | 126 |

RESULTATS ET DISCUSSION **130**

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE 1 : CARACTERISATION PHARMACOLOGIQUE DES NACHRS NATIFS DU SYNGANGLION DE LA TIQUE | |
| <i>IXODES RICINUS</i> | 132 |
| 1 - MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE DE DIFFERENTS SOUS-TYPES DE NACHRS DANS LES SYNGANGLIA DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 132 |
| 1.1 - Détermination des conditions expérimentales pour l'obtention de courants nicotiques | 132 |
| 1.2 - Identification de populations de récepteurs nicotiques sensibles et insensibles à l'α-Bgt | 134 |
| 1.3 - Effet d'un modulateur allostérique, le PNU-120596, sur l'activité des nAChRs du synganglion | 136 |
| 2 - CARACTERISATION PHARMACOLOGIQUE DES SOUS-TYPES DE NACHRS NATIFS DE LA TIQUE | 138 |
| 2.1 - Utilisation d'α-Bgt, de mécamylamine et de méthyllycaconitine | 138 |
| 2.2 - Etude de la sensibilité des nAChRs natifs de la tique <i>Ixodes ricinus</i> aux néonicotinoïdes | 141 |
| 2.3 - Effet du DEET et du flupyradifurone sur les nAChRs natifs de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 144 |
| 3 - CONCLUSION SUR LA CARACTERISATION DES PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES DES NACHRS EXPRIMES DANS LE SYNGANGLION DE LA TIQUE PAR LA TECHNIQUE DE MICROTRANSPLANTATION | 147 |
| 3.1 - Caractérisation pharmacologique des nAChRs | 147 |
| 3.2 - Mise au point de la technique de microtransplantation de préparations membranaires pour l'étude des nAChRs natifs de la tique | 152 |
| CHAPITRE 2 : ETUDE <i>IN VIVO</i> DU COMPORTEMENT D'EVITEMENT CHEZ LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 156 |
| 1 - COMPORTEMENT D'EVITEMENT DES TIQUES FACE AU DEET | 156 |
| 2 - EFFET DU FLUPYRADIFURONE (FLU) | 160 |
| 3 - EFFET DE LA COMBINAISON DE DEET ET DE FLU SUR LES TIQUES | 163 |
| 4 - CONCLUSION SUR LES TRAVAUX CONCERNANT L'ETUDE DE L'EFFET DU DEET ET DU FLU SUR LE COMPORTEMENT DE LA TIQUE | 165 |
| 4.1 - Effet répulsif du DEET, seul ou en combinaison avec le FLU | 165 |
| 4.2 - Validation d'un dispositif original pour les tests de comportement chez la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 166 |
| CHAPITRE 3 : CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUS-UNITES DE NACHRS DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 168 |
| 1 - CLONAGE DE QUATRE SOUS-UNITES DE NACHRS NEURONAUX DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 168 |
| 2 - CONCLUSION SUR LES SOUS-UNITES DE NACHRS IDENTIFIEES DANS LE SYNGANGLION DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 173 |

| | |
|--|------------|
| CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 174 |
| 1 - CARACTERISATION PHARMACOLOGIQUE DES NACHRS NATIFS DE LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 176 |
| 2 - ETUDE DU COMPORTEMENT D'EVITEMENT CHEZ LA TIQUE <i>IXODES RICINUS</i> | 177 |
| 3 - IDENTIFICATION MOLECULAIRE DES SOUS-UNITES DE NACHRS CHEZ LA TIQUE <i>I. RICINUS</i> | 178 |
| 4 - PERSPECTIVES D'ETUDES DE L'EXPRESSION DES SOUS-UNITES DES NACHRS D' <i>IXODES RICINUS</i> EN OVOCYTE DE XENOPE. | 179 |
| 5 - CONCLUSION GENERALE | 181 |
| RÉFÉRENCES | 182 |
| LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX | 216 |
| LISTE DES FIGURES | 218 |
| LISTE DES TABLEAUX | 220 |
| ANNEXES | 222 |
| ANNEXE 1 : RECAPITULATIFS DES PROGRAMMES PCR UTILISES | 223 |
| ANNEXE 2 : NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS IN THE SYNGANGLION OF THE TICK <i>IXODES RICINUS</i> : FUNCTIONAL CHARACTERIZATION USING MEMBRANE MICROTRANSPLANTATION (LE MAUFF ET AL., 2020) | 225 |
| ANNEXE 3 : EFFECT OF DEET AND FLUPYRADIFURONE ON THE TICK <i>IXODES RICINUS</i> : REPELLENCY BIOASSAY AND PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION BY MICROTRANSPLANTATION OF SYNGANGLION MEMBRANES (EN COURS DE SOUMISSION) | 233 |

Liste des abréviations

| | |
|---------------------|--|
| α | alpha |
| α -Bgt | alpha-Bugarotoxine |
| Ac-AChBP | <i>Aplysia californica</i> Acetylcholine Binding Protein |
| ACE | Acétamipride |
| ACh | Acétylcholine |
| AChBP | Acetylcholine-Binding Protein |
| AChE | Acétylcholinestérase |
| ADAR | Adénosines désaminases qui agissent sur l'ARN |
| ADNc | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| AMPA | Alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid |
| ANSES | Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| ARS | Agences Régionales de Santé |
| Asp | Acide aspartique |
| ATP | Adénosine-Triphosphate |
| β | Beta |
| β gal | Beta-galactosidase |
| BET | Bromure d'éthidium |
| γ | Gamma |
| Ca ²⁺ | Ion calcium |
| CaCl ₂ | Chlorure de calcium |
| CDC | Center for Disease Control and Prevention |
| CDS | Séquence ou région codante / Coding DNA Sequence |
| CLT | Clothianidine |
| CO ₂ | Dioxyde de carbone |
| Cys | Cystéine |
| CytP ₄₅₀ | Cytochrome P ₄₅₀ |
| δ | Delta |
| D | Acide aspartique |
| DDE | Dichlorodiphényldichloroéthylène |
| DDT | Dichlorodiphényltrichloroéthane |
| DEET | N,Ndiethyl-méthyl-m-toluamide |
| DHE | Dihydroxy- β -érythroïdine |
| DUM | Dorsal Unpaired Median |
| ϵ | Epsilon |
| E | Acide glutamique |
| EC ₅₀ | Half maximal Effective Concentration |
| ECDC | European Centre for Disease Prevention and Control |
| FLU | Flupyradifurone |
| G | Glycine |
| GABA | γ -aminobutyrique |
| GEK | Motif Glycine-Acide glutamique-Lysine |
| GLUR | Récepteur au glutamate |
| HE | Huile essentielle |
| HEK | Human Embryonic Kidney |

Liste des abréviations

| | |
|-----------------|--|
| HEPES | Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique |
| IMI | Imidaclopride |
| K | Lysine |
| K ⁺ | Ion potassium |
| KCl | Chlorure de potassium |
| LC50 | 50% Lethal Concentration |
| Leu | Leucine (ou L) |
| LGIC | Ligand-Gated Ion Channel |
| Ls-AChBP | <i>Lymnaea stagnalis</i> Acetylcholine Binding Protein |
| mAChR | Récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique |
| Mec | Mécamylamine |
| Met | Méthionine |
| MgCl | Chlorure de magnesium |
| MLA | méthyllycaconitine |
| mQ | milliQ |
| N | Asparagine |
| Na ⁺ | Sodium |
| nAChR | Récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique |
| NaCl | Chlorure de sodium |
| NAM | Negative Allosteric Modulator |
| Nic | Nicotine |
| NMDA | N-methyl-D-aspartate |
| NS-1738 | 1-(5-chloro-2-hydroxy-phenyl)-3-(2-chloro-5-trifluoromethyl-phenyl)-urea |
| NT1 | Tampon d'extraction du kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up |
| NT3 | Tampon de lavage du kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up |
| OMS | Organisme Mondial de la Santé |
| ORF | Open Reading Frame |
| P | Proline |
| PAM | Positive Allosteric Modulator |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PMD | p-menthane-3,8-diol |
| Pp-AChBP | <i>Pardosa pseudoannulata</i> Acetylcholine Binding Protein |
| Q | Glutamine |
| QSP | Quantité suffisante pour |
| R | Arginine |
| RACE-PCR | Rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction |
| RLT | Solution de lyse (ARN RNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen) |
| RPE | Solution de lavage de la membrane de silice (RNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen) |
| rpm | Rotation par minute |
| RW1 | Solution de lavage de la membrane de silice (RNeasy® Plant Mini Kit, Qiagen) |
| S | Sérine |
| SAM | Silent Allosteric Modulator |
| SNC | Système Nerveux Central |
| T | Thréonine |

Liste des abréviations

| | |
|----------|--|
| TBEv | Tick-Borne Encephalitis virus |
| TE | Tampon d'extraction (technique d'extraction de protéines) |
| TEVC | Two microelectrode voltage clamp |
| THX | Thiamétoxame |
| TM (1-4) | Domaine transmembranaire |
| TQS | 3a,4,5,9b-tetrahydro-4-(1-naphthalenyl)-3H-cyclopentan[c]quinoline-8-sulfonamide |
| TRP | Transient Receptor Potential |
| Trp | Tryptophane |
| Tyr | Tyrosine |
| US | United-States |
| UTR | Untranslated region |
| V | Valine |
| W | Tryptophane |
| WHO | World Health Organization |

Introduction

Chapitre 1 : Les tiques, un problème de santé mondial

1 - Les tiques et leur importance sur le plan médical et vétérinaire

Les tiques représentent un des groupes de vecteurs de maladies les plus importants au sein des arthropodes, au niveau de leur diversité, de leur localisation, des types de microorganismes qu'elles transmettent, et des hôtes qu'elles parasitent (Jongejan and Uilenberg 2004; Colwell, Dantas-Torres, and Otranto 2011; Parola and Raoult 2001). Les tiques sont des parasites hématophages qui se nourrissent généralement pendant plusieurs heures à plusieurs jours afin de réaliser leur mue (Oliver Jr 1989). Elles possèdent quatre stades de développement : l'œuf, la larve, la nymphe et le stade adulte où un polymorphisme est visible entre la femelle et le mâle (Nosek and Sixl 1972). Il existe une différence majeure au niveau des stades de développement, les larves ne possèdent que 6 pattes, contrairement aux nymphes et aux adultes qui en possèdent 8 (Anderson and Magnarelli 2008). En fonction de l'espèce de tique, le nombre d'hôtes obligatoires peut varier, d'un seul (la tique va réaliser son cycle de développement sur le même hôte), à trois hôtes (un hôte par stade de développement), ou plus pour les cycles polyphasiques¹ (Jongejan and Uilenberg 2004; Hoogstraal et al. 1985).

Les tiques peuvent porter au sein de leur organisme une grande diversité de microorganismes tels que des bactéries, des virus ou encore des protozoaires, qu'ils peuvent transmettre à l'Homme, aux animaux d'élevage et de compagnies (Stuen, Granquist, and Silaghi 2013b; Jongejan and Uilenberg 2004; Egyed et al. 2012). L'acquisition des pathogènes par les tiques se déroule généralement lors des repas effectués par les parasites à leurs différents stades de développement. Ainsi les pathogènes présents au niveau du système sanguin des hôtes vont se retrouver dans le

¹ Concerne les tiques se nourrissant sur plusieurs hôtes et réalisant plusieurs nymphoses durant leur cycle de développement, notamment chez les tiques molles.

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

système digestif de la tique. Ces agents pathogènes vont par la suite se multiplier à l'intérieur de la tique pour au final infecter le prochain hôte du parasite (Oliver et al. 2016; Keirans 1992). Environ 10% des tiques décrites dans le monde sont capables de transmettre des pathogènes aux animaux et à l'Homme (Jongejan and Uilenberg 2004), parmi elles, le genre *Ixodidae* est le plus représentatif (Oliver Jr 1989). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), environ 17% des maladies infectieuses diagnostiquées par an sont des maladies vectorielles causées par des bactéries, des virus ou encore des parasites (WHO 2020). Les maladies transmises par les tiques sont en augmentation dans le monde, c'est le cas de la maladie de Lyme (ou Borréliose de Lyme), une maladie découverte dans les années 1970 (Stanek et al. 2011; Steere et al. 1977). D'après le « *Center for Disease Control and Prevention* » (CDC), le nombre de cas diagnostiqués de Borréliose de Lyme était de 18 000 en 2000, alors qu'en 2018 il est passé à 34 000 aux Etats-Unis (CDC 2000, 2018), avec un nombre de cas par an plus élevé en Europe (85 000 cas/an) (Semenza and Menne 2009).

2 - Identification, description et phylogénie

Les tiques se divisent en trois familles, les *Argasidae* ou tiques molles, les *Ixodidae* ou tiques dures, et les *Nuttalliellidae*, ne comprenant qu'une espèce (**figure 1**). Les premières tiques ont été découvertes dans des fossiles datant du Crétacé (tiques dures présentes dans de l'ambre de Birmanie, datées de 100 millions d'années) et seraient des parasites associés aux reptiles (Poinar and Brown 2003). Elles ont été identifiées comme appartenant au genre *Cornupalpatum* qui serait proche du genre *Amblyomma* actuel (famille des *Ixodidae*). Une tique molle, proche de la morphologie du genre *Carios* (actuel, famille des *Argasidae*) a également été identifiée aux Etats-Unis, datant de 90 à 95 millions d'années (Turonien), (Klompen and Grimaldi 2001). D'après une étude de Dobson & Baker (1999), l'apparition des premières tiques daterait du Dévonien (390 millions d'années), où leurs hôtes probables seraient les reptiles, les oiseaux ou encore les amphibiens, car les mammifères n'étaient

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

pas encore apparus (Dobson and Barker 1999). De nos jours, près de 900 espèces de tiques ont été décrites dans le monde et sont présentes sur tous les continents (Petney et al. 2011).

La famille des tiques molles regroupe environ 200 espèces et comprend deux sous-familles distinctes : *Argasinae* et *Ornithodorinae* (Burger et al. 2014). Actuellement, la phylogénie et la systématique de cette famille n'est pas clairement établie au niveau des genres (Estrada-Peña et al. 2010), à cause notamment des différents schémas de classification qui ont été définis par l'école soviétique (Pospelova-Shtrom 1969), américaine (Hoogstraal et al. 1985; Keirans 1992), française (Camicas et al. 1998) ou encore par l'approche cladistique (Klompen and Oliver 1993). Malgré l'existence de nouvelles études moléculaires, il n'y a toujours pas de phylogénie claire, comparée aux nombreuses espèces étudiées pour les tiques dures (Nava, Guglielmone, and Mangold 2009; Burger et al. 2014). Les tiques molles sont présentes dans les hémisphères sud (régions Afrotropicales, Malgache, Australienne et Orientale) et nord (Amérique du nord, Europe et Sibérie), (Camicas et al. 1998; Holt et al. 2013). Elles possèdent, de manière générale, un cycle parasitaire appelé polyphasique (*i.e.*, prise de nombreux repas allant de plusieurs minutes à quelques heures avant de réaliser leur mue), (Hoogstraal et al. 1985). Les *Argasidae* regroupent les tiques possédant un tégument dépourvu de sclérification, d'où la dénomination de « tiques molles », et ont un mode de vie nidicole et endophile (Pospelova-Shtrom 1969). Au niveau de leur cycle de développement, les *Argasidae* possèdent plusieurs stades nymphaux (2 à 8), entre la larve et l'adulte, variant en fonction de l'espèce et de la quantité de sang ingérée par la tique (Oliver Jr 1989). De plus, les femelles sont capables de pondre entre 20 et 500 œufs après chaque repas de sang et après s'être reproduites avec un mâle hors de l'hôte (Oliver Jr 1989).

La famille des *Ixodidae*, dont l'apparition est plus récente (environ 120 millions d'années, en Australie (Klompen et al. 1996; Barker and Murrell 2004), représente environ 80% des espèces de tiques dans le monde, soit près de 700 espèces comprises dans 7 genres principaux : *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus* et *Ixodes* (Jongejan and Uilenberg 2004). Leur

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

répartition mondiale est plus importante que les *Argasidae* car des espèces ont été décrites plus largement dans les hémisphères nord (jusque dans la région Sino-japonaise) et sud (Amérique du Sud et région arabe), et également dans la zone océanique avec des espèces décrites dans les régions Orientale, Océanienne et Australienne (Kolonin 2009; Holt et al. 2013). Elles sont appelées tiques dures car elles possèdent un *scutum* dorsal rigide qui protège un tiers de leur corps, sauf chez les mâles où le *scutum* recouvre l'ensemble du corps (Anderson and Magnarelli 2008). Elles possèdent 4 stades de développement avec un stade nymphal unique (contrairement aux tiques molles), et des cycles dit monophasique, diphasique, ou triphasique (c'est à dire entre un à trois hôtes obligatoires) au cours de leur développement (Petney et al. 2011). En effet, pour le cycle monophasique, la tique effectue son cycle de développement complet sur le même hôte, alors que pour le cycle diphasique, la larve et la nymphe se nourrissent sur un seul hôte et les tiques adultes se nourrissent sur un autre hôte. Enfin pour le cycle triphasique, à chaque stade de développement un nouvel hôte est utilisé par la tique pour se nourrir (Oliver Jr 1989). Il faut noter que, pour certaines espèces de tiques dures, les adultes se reproduisent sur l'hôte, où la femelle prend son dernier repas jusqu'à être gorgée à réplétion. Ensuite elle se laisse tomber au sol pour pondre ses œufs (entre 1 000 et 20 000 suivant les espèces), en une seule ponte avant de mourir (Oliver Jr 1989; Jongejans and Uilenberg 2004).

Comme indiqué plus haut, la famille des *Nuttalliellidae* ne contient qu'une seule espèce, *Nuttalliella namaqua* (Guglielmone 2010). Sa description a été réalisée dans une seule région géographique, la région Afrotropicale (Mans et al. 2011; Holt et al. 2013). Malgré le peu d'information disponible, l'espèce *N. namaqua* montre des caractéristiques morphologiques communes avec les tiques de la famille des *Argasidae* : des téguments similaires, elles se nourrissent rapidement sur l'hôte, et des *Ixodidae* : un *pseudo-scutum* rappelant le *scutum* des tiques dures (Bedford 1931; Mans et al. 2011). *Nuttalliella namaqua* est décrite comme pouvant être le lien évolutif entre les tiques molles et les tiques dures. Il a même été proposé que *N. namaqua* est un fossile vivant, datant du Carbonifère-Permien précoce (Mans et al. 2011). L'analyse du contenu intestinal de cette espèce et

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

les lieux de sa collecte (intérieur des terriers) ont permis de déterminer que *N. namaqua* est généraliste et qu'elle parasite des reptiles (*Mabuya*, *Pachydactylus*, *Cordylidae*) et des mammifères (*Hyracoidea*, *Herpestidae*, *Muridae*), (Mans et al. 2014; Keirans et al. 1976).

En France, les espèces les plus fréquentes appartiennent respectivement aux genres *Ixodes* et *Dermacentor* pour les tiques dures et *Argas* pour les tiques molles (**Figure 1**), (Boulanger et al. 2019).

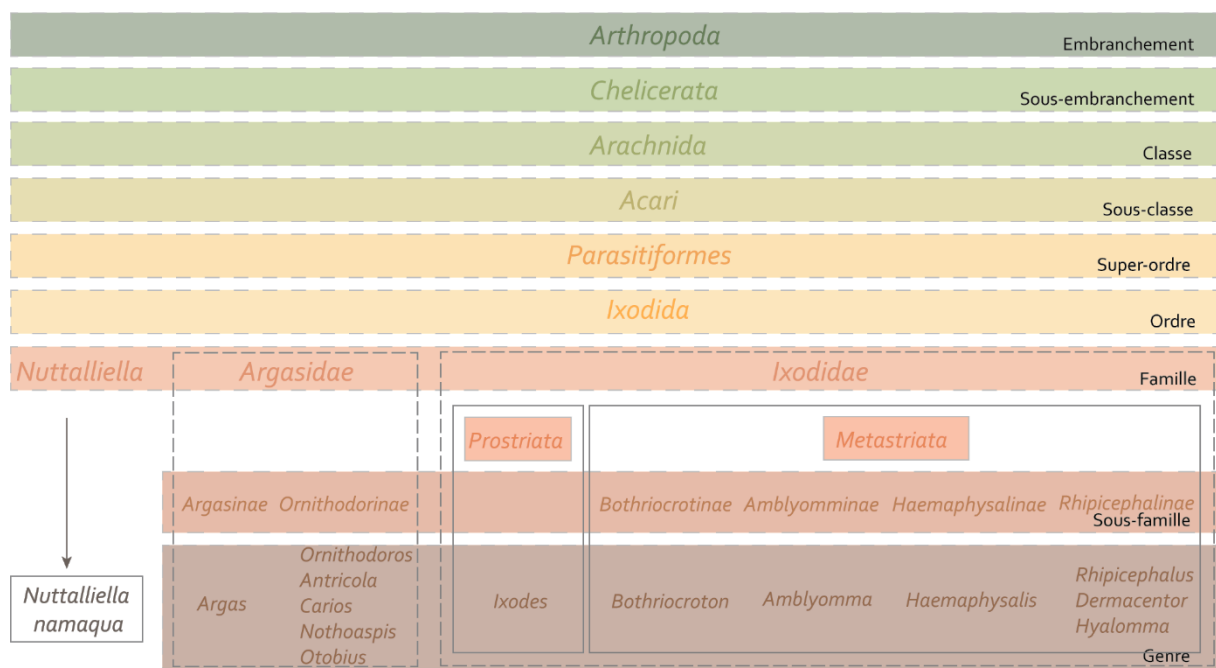


Figure 1 : Illustration schématique représentant la phylogénie des tiques à partir de l'embranchement des arthropodes jusqu'aux différents genres connus actuellement.

3 - Recherche des hôtes

La recherche d'hôte chez la tique a lieu à tous les stades de développement, les individus vont se mettre à l'affût, en hauteur au niveau des herbes et attendre qu'un animal passe pour s'y accrocher. En effet, les tiques possèdent des cellules photosensibles au niveau dorsal, et des organes sensoriels olfactifs au niveau des tarse de leur première paire de pattes appelés organes de Haller (Carr et al. 2017). Grâce à ces différents organes, les tiques sont capables de détecter la photopériode, la température, l'humidité, le CO₂ et les vibrations environnantes leur permettant de détecter la présence d'hôtes à proximité (Boulangier et al. 2019; Medlock et al. 2013; Anderson and Magnarelli 2008; Balashov 1972; Obenchain and Galun 1982; Hess and Vlimant 1986). Les larves ne sont pas capables de parcourir de grandes distances, elles vont plutôt attendre à leur point d'éclosion qu'un hôte passe, afin de s'y attacher pour se nourrir. C'est grâce aux déplacements de l'hôte que les larves vont être dispersées dans l'environnement (Anderson and Magnarelli 2008), leur dispersion est ainsi fonction du type d'hôte qu'elles vont parasiter (Medlock et al. 2013). Le taux d'infestation des hôtes va également varier en fonction des saisons où la tique sera la plus active et les hôtes disponibles (Medlock et al. 2013). Des études ont également montré que les aires de répartition des hôtes (infectés ou non par les pathogènes) et des tiques se superposent (Swanson et al. 2006).

La température est un facteur essentiel dans la dynamique des populations de tiques, en agissant sur leur niveau d'activité (Oliver Jr 1989). Des phases de diapause sont observées en hiver lorsque les températures sont trop basses (<5°C) et que les périodes diurnes sont trop courtes (Jaenson and Lindgren 2011). Les tiques reprennent généralement la recherche d'hôtes au printemps, lorsque les températures se radoucissent et que le taux d'humidité est suffisant (Medlock et al. 2013). Ainsi, *I. ricinus* est plus active lorsque la température est comprise entre 5 et 30 °C (Jaenson and Lindgren 2011). Des températures élevées, proches de 30 °C peuvent permettre d'augmenter la densité des populations de tiques (Randolph 2004), mais une augmentation trop importante de la température associée à un assèchement de l'air ambiant est défavorable au développement et à la

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

survie de tiques. Ainsi, plus l'hygrométrie est faible et plus les tiques sont obligées de redescendre au niveau du sol, où le couvert végétal et l'humidité de la terre permettent de se réhydrater, mais cela limite aussi leur capacité à trouver un hôte (Perret et al. 2003).

4 - Repas sanguin de la tique

Le repas sanguin de la tique utilise trois parties de son système digestif, (1) le pharynx et l'œsophage pour l'acquisition du sang de l'hôte, (2) l'intestin pour la digestion du sang et (3) le rectum et l'anus pour l'accumulation et l'élimination des déchets (**Figure 2**), (Sonenshine and Roe 2014). L'aspiration du sang de l'hôte et la libération de la salive de la tique s'effectue en alternance au travers d'un canal commun (Vancová et al. 2020). Suite à l'acquisition du sang, sa digestion est réalisée dans les cellules de l'intestin moyen, où l'hémoglobine, les protéines, les fragments cellulaires y sont dénaturés (Sojka et al. 2013). L'hémoglobine est la source primaire de nourriture de la tique, le sang lui est donc nécessaire pour survivre, se développer et se reproduire (Anderson and Magnarelli 2008). Le repas de la tique peut également être présenté comme le passage de pathogènes, provenant d'un hôte infecté, au sein du système digestif de la tique. Cette acquisition de pathogènes permettra à la tique de transmettre par la suite ces mêmes pathogènes à un autre hôte sain (Anderson and Magnarelli 2008). De plus, une membrane péritrophique va se créer autour du sang prélevé chez l'hôte lors d'un repas sanguin (Sonenshine and Roe 2014; Zhu, Gern, and Aeschlimann 1991). Cette membrane aurait un rôle dans le passage de certains pathogènes (comme *Babesia microti*) et ainsi l'infection des hôtes lors du gorgement de la tique (Zhu, Gern, and Aeschlimann 1991; Rudzinska et al. 1982). Juste après la pique et l'installation de la tique dans la peau de l'hôte, le parasite ne va pas augmenter son poids durant les premières 24h. Au bout de quelques jours le poids de la tique va augmenter doucement et les derniers jours d'attachement une augmentation significative est observée (Kemp, Stone, and Binnington 1982). La digestion chez la femelle adulte s'effectue en 3

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

étapes : la première est une digestion continue (initiée par le nourrissage) lors d'un gorgement lent, la deuxième est une digestion moins rapide (ralentie par l'accouplement avec un mâle) ayant lieu pendant un gorgement plus rapide, puis une digestion à nouveau continue (causée par le détachement de l'hôte) se produisant pendant les périodes de post-nourrissage, de pré-ovoposition et d'ovoposition (Tarnowski and Coons 1989).

5 - La tique *Ixodes ricinus*

5.1 - Anatomie générale

La tique *I. ricinus* est reconnaissable grâce à la plaque rigide au niveau dorsal (*scutum*) ainsi qu'à son appendice buccal (*capitulum*) qui s'étend à l'extérieur de son corps. Le corps des tiques (sans tête distincte et comprenant les pattes) est divisé en deux parties, (1) le *capitulum* (ou *gnathosoma*) relié par une membrane flexible au (2) corps (*idiosoma*), (**Figure 3**), (Anderson and Magnarelli 2008; Nicholson et al. 2019). Son appartenance au genre *Ixodes* est déterminée par la présence d'un sillon anal qui encercle l'anus de la tique au niveau antérieur (**Figure 3 B**), (Nicholson et al. 2019; Nosek and Sixl 1972). Le corps peut être décrit en deux parties, dans la partie antérieure (reliée au *capitulum*) il y a le pore génital chez la femelle et les insertions pour les 4 paires de pattes (Anderson and Magnarelli 2008). Le pore génital n'est pas visible chez les larves et les nymphes car il est fermé, et s'ouvre uniquement au stade adulte chez les femelles (Nosek and Sixl 1972). Au niveau de la partie postérieure, des spiracles sont présentes ainsi que l'anus (**Figure 3**). La cuticule flexible du corps des tiques (à l'exception du *scutum*) permet d'étendre le corps des parasites pendant qu'elles se gorgent de sang, pour les femelles uniquement (Anderson and Magnarelli 2008).

Contrairement à d'autres arthropodes hématophages, les tiques doivent se nourrir pendant plusieurs jours et donc rester ancrées fermement au niveau de la peau de l'hôte (Anderson and Magnarelli 2008; Richter et al. 2013). Ce sont les pièces buccales qui ont cette fonction chez la tique.

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

Elles sont présentes au niveau du *capitulum*, et comprennent deux palpes possédant un grand nombre de chimio-senseurs (**Figure 3 A, B et C**), (Anderson and Magnarelli 2008; Nicholson et al. 2019). Ces palpes ne passent pas la barrière épithéliale des hôtes, elles sont positionnées à la surface de la peau pendant que la tique se nourrit (Richter et al. 2013). Une paire de chélicères est présente depuis la base du *capitulum* et remonte jusqu'au niveau des palpes. Elles sont très mobiles et peuvent être comparées à deux couteaux qui permettent de percer la peau de l'hôte (Nicholson et al. 2019; Richter et al. 2013). Juste au niveau des chélicères se trouve la partie la plus importante pour le nourrissage chez la tique, l'hypostome, qui possède des dendrites au niveau ventral sur sa surface externe, alors que sa surface dorsale est recouverte par les chélicères (**Figure 3 C**). L'ensemble hypostome (côté ventral) recouvert par les chélicères (côté dorsal) forme un canal qui permet de récupérer rapidement le sang de l'hôte en restant ancré dans l'épiderme de celui-ci (Anderson and Magnarelli 2008).

5.2 - Les glandes salivaires

Les glandes salivaires ont un rôle très important chez les tiques au niveau de leur phase libre (capture de l'eau environnementale et sécrétion de substances hygroscopiques), (Kirkland 1971) et également lors des phases parasitaires pendant lesquelles la tique secrète la salive et le ciment liant la tique à la peau de l'hôte (Binnington and Kemp 1980). Ainsi, lors de sa phase parasitaire et suite à l'insertion de l'hypostome dans la peau de l'hôte, la tique va sécréter une substance appelée « ciment » (produit par les glandes salivaires) qui va lui permettre de se maintenir à l'endroit où elle a piqué, et éviter d'être retirée par son hôte de façon prématurée (Kemp, Stone, and Binnington 1982). Durant le gorgement, la tique va en même temps excréter des fluides (ions et eau en excès) vers l'hôte par le biais des glandes salivaires (Lees 1946). Au niveau morphologique, ces glandes ont une structure en grappe de raisin appelés *acini* (agranulaire et granulaire, **Figure 2**). Il existe 3 types d'acini chez les femelles (types I-III) et 4 chez les mâles (types I-IV), (Coons and Alberti 1999). Les acini agranulaires (type I) sont des excréteurs et des osmorégulateurs (évacuation de l'eau en excès et des ions pour le

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

maintien d'une bonne pression osmotique), (Kirkland 1971). Leur forme et leur structure n'est pas modifiée lors du repas sanguin de la tique (Sauer, Essenberg, and Bowman 2000). Les acini de type I ont également un rôle dans l'excrétion de fluides hyper-osmotiques permettant aux tiques non-nourries (pendant leur phase non-parasitaire) de s'hydrater avec la vapeur d'eau atmosphérique (Bowman and Sauer 2004). Au contraire, les acini de types II et III (granulaires) qui grossissent significativement lors de la période d'attachement et de nourrissage de la tique, permettent la sécrétion de protéines bioactives et de lipides présents dans la salive et possédant diverses activités pharmacologiques (Sauer, Essenberg, and Bowman 2000). La salive contient également des enzymes permettant d'aspirer le sang en continu (anticoagulants, facteurs inhibant la douleur et modulant le système immunitaire, enzymes protéolytiques, etc.), (Bowman et al. 1997).

La salive des tiques a été beaucoup étudiée afin de comprendre les mécanismes mis en jeu pour permettre à la tique de se nourrir sans être détectée par les hôtes (Steen, Barker, and Alewood 2006; Kemp, Stone, and Binnington 1982). Lors de la pique, la salive va être dans un premier temps injectée au niveau du site de nourrissage avant que le sang soit aspiré, après cette étape la tique alterne entre aspiration de sang et injection de salive (Stone, Commins, and Kemp 1983). Ce parasite est capable de moduler l'hémostase chez son hôte. C'est un processus complexe pour contrôler la perte de sang après une lésion vasculaire, par la mise en place de plusieurs événements physiologiques, permettant la vasoconstriction au niveau des vaisseaux endommagés, l'agrégation plaquettaire, la formation d'un caillot de fibrine et la fibrinolyse (Hoffman et al. 2013). Actuellement, seulement des substances vasodilatatrices non protéiques ont été identifiées dans la salive des tiques, comme des dérivés lipidiques de prostacycline et des prostaglandines (Bowman, Dillwith, and Sauer 1996; Ribeiro and Mather 1998). Un inhibiteur de serine, la serpine IRS-2, a été identifié chez *I. ricinus*, et est capable d'inhiber de façon irréversible les protéases telles que la chymase, la cathepsine G ou encore la thrombine, des composés induisant l'agrégation plaquettaire ou encore la coagulation (Chmelar et al. 2011; Chmelar et al. 2012). D'autres inhibiteurs ont été décrits, comme l'Ir-CPI, un

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

inhibiteur de la phase contact (contact du sang avec les structures sous-endothéliales) qui permet d'inhiber la voie intrinsèque de la coagulation chez l'hôte (Decrem et al. 2009), ainsi qu'une autre serpine, Iris, qui impacte globalement les réactions de défense de l'hôte (Prevot et al. 2006). En effet, Iris est capable d'avoir un effet sur l'hémostase (adhésion plaquettaire, phase contact initiant la coagulation, et la fibrinolyse) et sur la réaction immunitaire de l'hôte (Prevot et al. 2006).

La salive de la tique a donc un impact sur l'immunité des hôtes (acquise et innée), en inhibant les réponses immunitaires afin d'empêcher le rejet de la tique par l'hôte et l'arrêt du repas sanguin (Leboulle et al. 2002; Brossard and Wikel 2008). Plusieurs protéines ont été décrites chez *I. ricinus* comme ayant un effet sur la réponse immunitaire de l'hôte, particulièrement l'Ir-LBP qui diminue le recrutement de neutrophiles (Beaufays et al. 2008), ainsi que l'IRAC-I et II qui inhibent la convertase C₃ ayant un rôle dans l'immunité innée (Daix et al. 2007). La salive de la tique peut aussi impacter la réponse adaptative immunitaire de l'hôte, c'est le cas de la protéine Iris qui inhibe la prolifération des lymphocytes T (Leboulle et al. 2002). L'inhibition de la réponse immunitaire de l'hôte peut également profiter à la transmission d'agents pathogènes présents dans la salive de la tique. En effet une protéine inhibitrice des lymphocytes B, appelée BIP, ainsi qu'un dérivé des protéines de la famille des Salp (régulateurs de la signalisation lymphocytaire), homologue de la protéine Salp₁₅, sont impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire et également dans la transmission des *Borrelia* (Hovius et al. 2007; Hannier et al. 2004). Malgré ces nombreuses défenses contre les réactions de l'hôte, la salive de la tique peut également être allergisante. Une réaction rapide épidermique à l'endroit où a eu lieu la pique est alors visible. Par exemple le développement d'un érythème migrant connu lors de la transmission de bactéries causant la Borréliose de Lyme (Stanek et al. 2012).

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

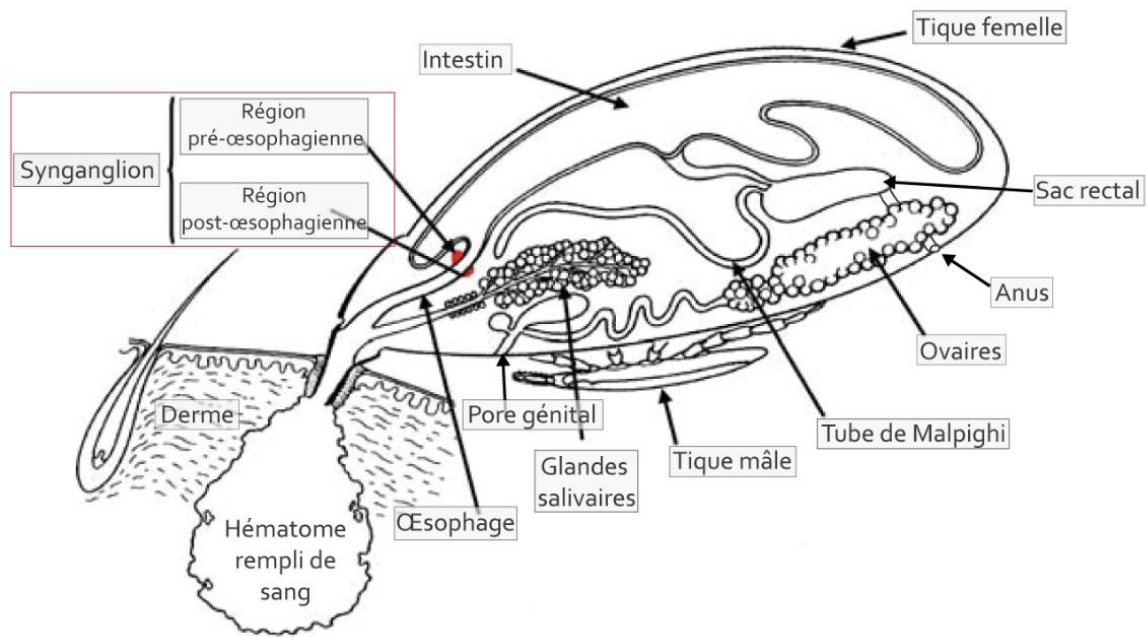


Figure 2 : Anatomie interne d'une tique femelle du genre *Ixodes* en train de se nourrir et d'être fécondée par un mâle

Le système nerveux central de la tique est indiqué en rouge, Lees et Bowman 2007.

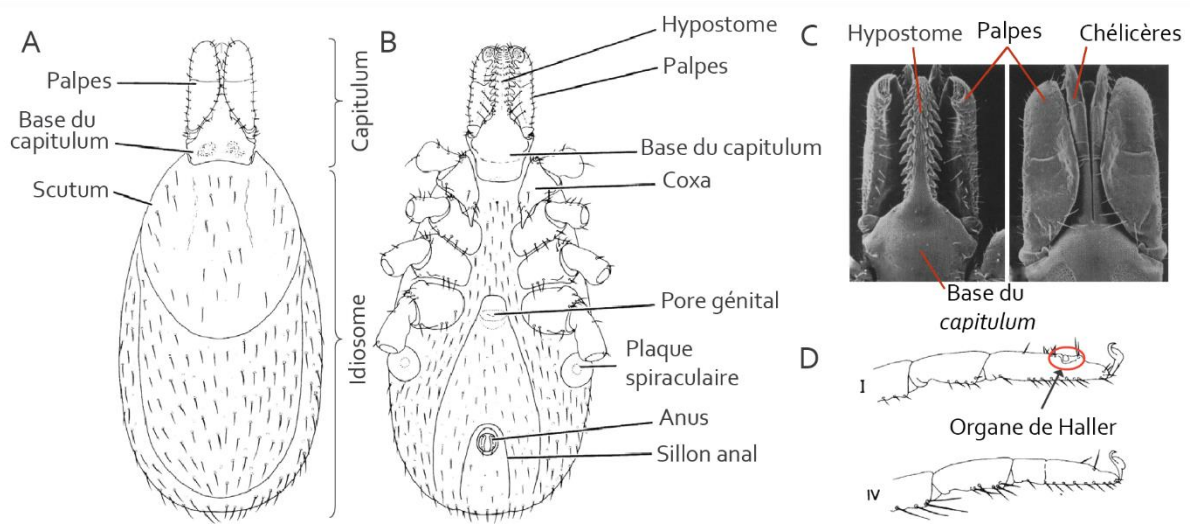


Figure 3 : Représentation de l'anatomie de la tique du genre *Ixodes*.

(A) Schéma en vue dorsale, (B) en vue ventrale, (C) images en microscopie électronique du capitulum de la tique et (D) schéma de la première patte (I) comportant l'organe de Haller et la 4^{ème} patte (IV), d'après (Nicholson et al. 2019).

5.3 - Cycle de développement

La tique *I. ricinus* possède un cycle de développement à trois hôtes obligatoires (**Figure 4**), ce qui signifie qu'à chaque étape de son développement elle devra se nourrir sur un nouvel hôte, jusqu'à être gorgée à réplétion (avoir ingurgité une quantité de sang maximale en fonction de leur stade de développement) et se décrocher pour accomplir sa mue (Nicholson et al. 2019). Ainsi, après chaque mue, la tique *I. ricinus* doit rechercher un nouvel hôte pour se nourrir. Au stade de larve, les tiques se nourrissent entre 2 à 3 jours, alors que les nymphes se nourrissent entre 4 à 5 jours (Anderson and Magnarelli 2008). Les parasites vont se nourrir généralement sur des petits mammifères, des oiseaux ou des reptiles comme des lézards (**Figure 4**), (Medlock et al. 2013). Au stade adulte, seule la tique femelle va se nourrir sur l'hôte, et son repas va durer en moyenne plus de deux semaines (Anderson and Magnarelli 2008). Les femelles adultes gorgées peuvent atteindre 1,3 cm en taille et augmenter leur poids jusqu'à 100 fois (Boulanger et al. 2019). Le mâle, de son côté, va uniquement rechercher des femelles avec lesquelles il peut s'accoupler, principalement pendant la phase libre des femelles (hors des hôtes) mais cela peut également arriver lorsque la femelle est attachée à un hôte. (Jongejan and Uilenberg 2004). Il faut noter que les tiques adultes vont généralement se nourrir sur des animaux de taille plus importantes (en comparaison avec les hôtes des larves et des nymphes) comme le chevreuil ou des animaux d'élevage (**Figure 4**), (Nicholson et al. 2019; Medlock et al. 2013; Stuen, Granquist, and Silaghi 2013b).

Un cycle de développement complet peut durer entre 2 et 6 ans en fonction des conditions environnementales (Anderson and Magnarelli 2008), notamment la température et l'humidité ambiante (Wilson and Elston 2018). L'activité des tiques va commencer durant l'été avec l'éclosion des œufs et l'arrivée des larves, incluant une période de dormance pour celles-ci. Des études ont montré une saisonnalité dans l'activité des tiques et dans leur recherche d'hôtes. En effet, les nymphes et les adultes de l'espèce *I. ricinus* possèdent un premier pic d'activité au printemps et en début d'été, et un second au début de l'automne. Les larves vont quant à elles être actives durant la

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

période automnale (Kurtenbach et al. 2006). Suite à leur premier repas, les larves vont devenir des nymphes au printemps, qui, après un second repas vont muer et devenir des individus adultes à l'automne. Pendant l'automne et l'hiver, à la suite de son dernier repas et à condition de s'être reproduit avec un mâle, la femelle va pondre environ 2000 œufs qui émergeront au début de l'été suivant (Swanson et al. 2006).

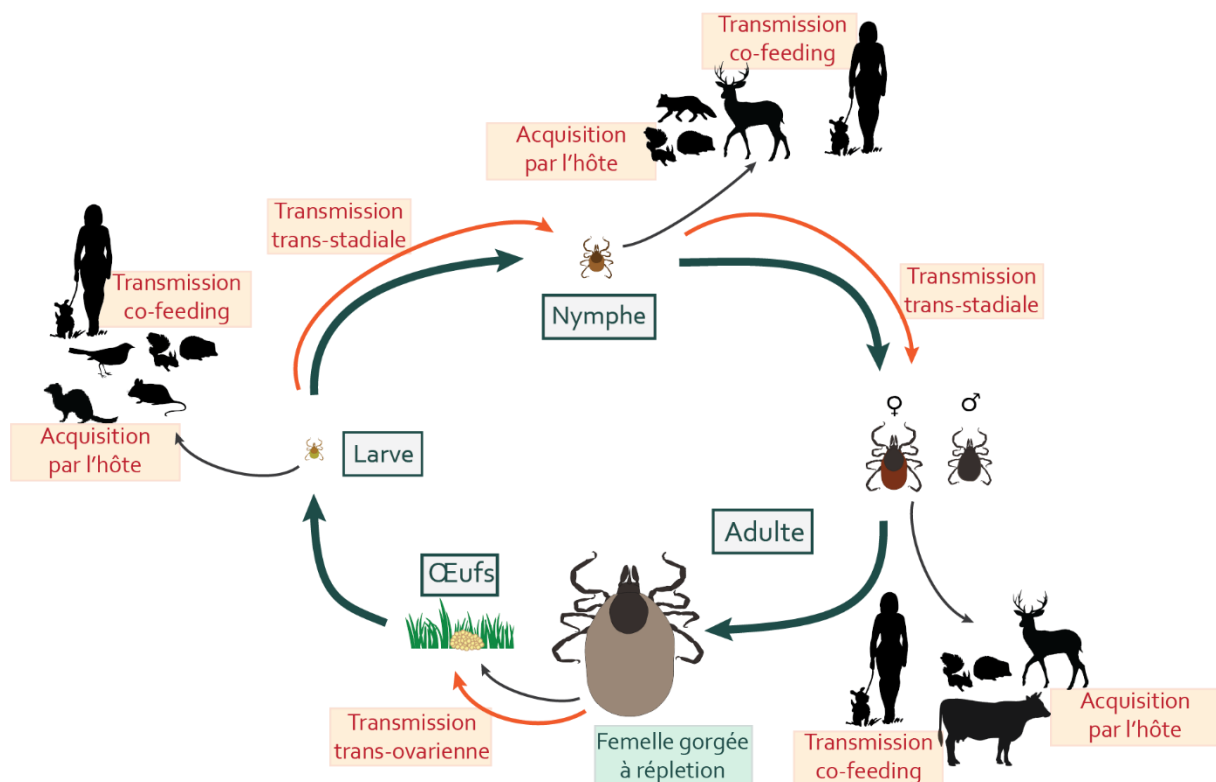


Figure 4 : Représentation schématique du cycle de développement de la tique *Ixodes ricinus* et des différents modes de transmission des pathogènes entre les tiques et les hôtes mais également entre les tiques elles-mêmes.

Les larves vont parasiter des petits animaux tels que des petits mammifères (rongeurs, hérissons, fouines), ou encore des oiseaux. Les nymphes et les adultes peuvent également se nourrir sur des mammifères de taille plus importante comme les renards ou encore les chevreuils et les animaux d'élevage ou de compagnie. La liste des hôtes n'est pas exhaustive, ils sont illustrés par l'image d'un animal représentant un groupe taxonomique d'espèces qui peuvent être parasitées par la tique. La transmission de pathogène peut avoir lieu de la femelle à ses œufs (transmission trans-ovarienne), du stade de larve au stade de nymphe ou encore de la nymphe à l'adulte (transmission transstadial), quand la tique est infectée par un hôte qu'elle parasite (acquisition des pathogènes par l'hôte), ou encore quand elle parasite un hôte sain où une autre tique infectée se nourrit également (transmission co-feeding). La proportion des tiques suivant ses différents stades de développement a été conservée mais la taille des animaux n'est pas représentée en taille réelle.

5.4 - Ecosystème et répartition géographique

Depuis le début du 20^{ème} siècle, les tiques du genre *Ixodes* vivent dans des écosystèmes forestiers anthropisés, où leurs hôtes privilégiés prolifèrent (chevreuil, petits rongeurs, ...), (Milne 1949). Il faut en effet qu'il y ait une abondance d'hôtes potentiels de la tique, pour lui permettre de se nourrir et se développer (Swanson et al. 2006). Sa distribution géographique (**Figure 5**), établie en 2018, s'étend de l'Est du Royaume-Uni jusqu'au fleuve Volga à l'Ouest, puis du sud de la Finlande jusqu'au nord de l'Afrique (Estrada-Peña, Mihalca, and Petney 2018). De plus, l'augmentation des températures liée au changement climatique est corrélée à la présence des tiques *I. ricinus* dans les régions du nord et au niveau des hautes altitudes dans les régions montagneuses, qui offrent des températures plus favorables à leur survie comparées à celles présentes dans les paysages continentaux (Medlock et al. 2013). Le développement des activités humaines et la modification de l'environnement et des écosystèmes par la végétalisation des zones urbaines, l'agriculture, etc., favorisent le développement des populations d'hôtes et donc la prolifération d'*I. ricinus*. La majorité des milieux y compris les zones urbaines et péri-urbaines sont infectées par l'espèce *I. ricinus* (Gassner, Hansford, and Medlock 2016). Cette tique est présente généralement dans des milieux de type boisés, permettant un accès à la végétation au niveau du sol pour se protéger notamment de la sécheresse. Elle est très sensible aux conditions climatiques, notamment au niveau du taux d'humidité ambiant. Lorsque la tique n'est pas attachée à un hôte, elle a besoin d'un taux d'humidité d'environ 80% dans l'environnement pour survivre (Knap et al. 2009). Ainsi les zones où les tiques rechercheront des hôtes doivent être avec un climat comprenant des pluies régulières ainsi qu'une végétation qui retient l'humidité au niveau du sol (arbres, arbustes, herbes hautes, feuilles mortes sur le sol, etc.), (Anderson and Magnarelli 2008). La végétation représente également des supports qui seront utilisés par les tiques pour trouver des hôtes à parasiter. De plus, la présence de certaines espèces végétales va avoir un rôle dans l'attraction des espèces d'hôtes dans l'environnement. Ainsi la présence d'arbres fruitiers, comme le cerisier et le pommier, est favorable au développement des populations d'*I. ricinus* car les

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

fruits trop mûrs vont attirer les hôtes se nourrissant au sol (Boyard et al. 2011; Boyard et al. 2007b). La diversité des paysages européens comporte une forte proportion d'environnements boisés, permettant le maintien des populations de tiques, par exemple dans des forêts de conifères et de feuillus, des landes, des pâturages ou encore dans les parcs urbains (Medlock et al. 2013).

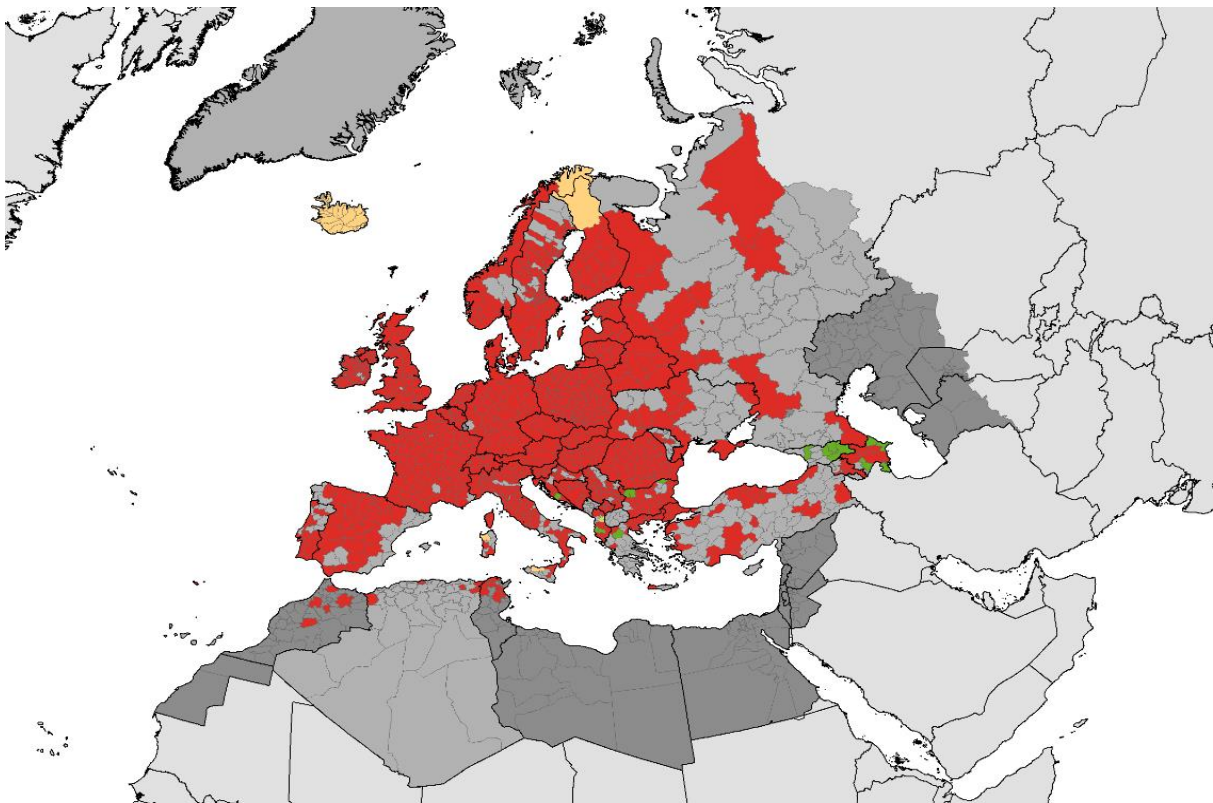


Figure 5 : Répartition de l'espèce *Ixodes ricinus*.

En rouge, les régions correspondant à la localisation de la tique *I. ricinus*. En jaune clair, les régions où *I. ricinus* a été introduite et en vert où la tique n'a pas été observée (ECDC 2021).

6 - Impacts de la tique *Ixodes ricinus* sur la santé humaine

6.1 - *Ixodes ricinus*, vecteur de maladies humaines

Les tiques appartenant à l'espèce *I. ricinus* sont les plus étudiées en Europe centrale. Elles ont été décrites comme étant fortement impliquées dans la transmission de pathogènes causant des maladies humaines en Europe (Swanson et al. 2006; Petney, Pfäffle, and Skuballa 2012). Les principales maladies transmises par la tique *I. ricinus* sont la maladie de Lyme provoquée par les bactéries *Borrelia burgdorferi*, l'anaplasmose granulocytaire humaine causée par la bactérie *Anaplasma phagocytophilum*, la babésiose induite par des protozoaires du genre *Babesia*, ou encore l'encéphalite à tique causée par un *flavivirus* (**Tableau 1**), (Medlock et al. 2013; Lindquist 2008; Rizzoli et al. 2011; Uilenberg 2006). La tique peut se nourrir sur des hôtes appelés « réservoirs » de certains microorganismes pathogènes. Le terme « réservoir » définit le fait que l'hôte doit être capable de survivre à l'infection du pathogène et ne pas résister au parasitisme de la tique ce qui constitue les conditions propices à la transmission de l'agent infectieux vers la tique. (Stuen, Granquist, and Silaghi 2013a). Les rongeurs sont les hôtes réservoirs les plus fréquents (Gern et al. 1998). Ce sont des espèces aux populations nombreuses et denses, et souvent parasitées par différents vecteurs de pathogènes. Ce sont la plupart du temps des hôtes parasités par les tiques immatures (larves et nymphes). Plusieurs études ont été réalisées concernant les hôtes de type rongeurs comme chez des espèces appartenant au genre *Apodemus* et *Myodes*, connus pour être impliqués dans le cycle de transmission des bactéries causant la Borréliose de Lyme (Lane, Piesman, and Burgdorfer 1991; Mlera and Bloom 2018). Le parasitisme des tiques sur les rongeurs permet également aux jeunes tiques, peu mobiles, d'être dispersées dans l'environnement suite au déplacement des micromammifères. Cela contribue ainsi à la propagation des pathogènes présents dans les tiques nouvellement infectées (Karbowski et al. 2015). La piqure des tiques peut engendrer des zoonoses suite à la transmission d'agents

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

pathogènes. L'Homme peut être décrit comme un hôte accidentel de la tique car il n'est pas présent de manière fréquente dans le milieu de vie des tiques (Swanson et al. 2006).

6.2 - Acquisition des pathogènes chez les tiques

Les larves et les nymphes sont principalement infectées par des agents pathogènes par le biais des hôtes qu'elles parasitent. De plus, elles sont capables de conserver les pathogènes entre leurs différents stades de développement (transmission trans-stadiale, **Figure 4**), (Swanson et al. 2006). Les larves ne sont généralement pas ou peu infectées juste après leur éclosion par *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum*, les bactéries *Rickettsia*, *Bartonella* ou *Francisella*. Elles le deviennent lorsqu'elles se nourrissent sur des hôtes tels que des micromammifères, des oiseaux ou encore des lézards (**Figure 4, Tableau 1**). Dans des rares cas, les larves peuvent être infectées par un microorganisme transmis par la femelle adulte à ses œufs. Cette transmission est appelée trans-ovarienne et a été décrite au niveau des tiques *I. ricinus* lors de la conservation des protozoaires *Babesia* ou encore pour le virus provoquant l'encéphalite à tique (*flavivirus*, TBEv), (Nicholson et al. 2019). Ainsi, un œuf qui est infecté va permettre au virus d'être conservé dans l'organisme de la tique au cours de son développement et potentiellement d'être transmis à d'autres hôtes lors des repas du parasite (**Figure 4**), (Michelitsch et al. 2019). Pour ce mode de transmission la tique peut être considérée comme hôte « réservoir », car le pathogène va se maintenir au sein de la population de tique, ainsi que dans la descendance de chaque femelle. Un dernier mode de transmission a été décrit au cours d'un repas de plusieurs tiques sur un même hôte. Si une tique infectée par un pathogène se nourrit sur un hôte sain, elle peut infecter d'autres tiques saines se nourrissant sur le même hôte. Cette transmission est appelée co-alimentation ou « co-feeding ». Elle a été décrite pour la transmission du virus TBE et pour les *Borrelia* causant la maladie de Lyme (**Figure 4**), (Randolph 2004).

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

Tableau 1 : Liste des différents pathogènes pour l'Homme pouvant être transmis par la tique *Ixodes ricinus* (Liste des pathogènes les plus fréquents, non exhaustive).

| Type d'organisme | Agent pathogène | Maladie | Hôte réservoir | Mode de transmission | Références |
|---------------------------------|--|---------------------------|---|--|---|
| Bactéries | <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> | Borréliose de Lyme | Micromammifères (<i>Apodemus</i> , <i>Myodes</i> , <i>Erinaceus</i>), oiseaux, reptiles, chevreuils | Depuis l'hôte, co-feeding | (Talleklint and Jaenson 1994; Semenza and Menne 2009; Skuballa et al. 2012; Rauter and Hartung 2005) |
| | <i>Anaplasma phagocytophilum</i> | Anaplasmose | Divers mammifères (élevage, compagnie) | Depuis l'hôte, co-feeding | (Silaghi et al. 2008; Hartelt et al. 2004) |
| | <i>Rickettsia helvetica</i> , <i>R. monacensis</i> | Fièvre boutonneuse | Rongeurs | Depuis l'hôte, co-feeding | (Nilsson et al. 1999; Schorn et al. 2011) |
| | <i>Borrelia miyamotoi</i> | Fièvre récurrente | Rongeurs | Depuis l'hôte, co-feeding | (Platonov et al. 2011; Cochez et al. 2015) |
| | <i>Bartonella henselae</i> | Bartonellose | Rongeurs | Depuis l'hôte, co-feeding | (Cotté et al. 2008) |
| | <i>Francisella tularensis</i> | Tularémie | Lagomorphes, rongeurs | Depuis l'hôte, co-feeding | (Genchi et al. 2015) |
| Virus | <i>Flavivirus (TBEv)</i> | Encéphalite à tique (TBE) | Mammifères sauvages, rongeurs, tiques | Depuis l'hôte, co-feeding, trans-stadiale, trans-ovarienne | (Daniel et al. 2018; Badawi et al. 2017) |
| Parasites (protozoaires) | <i>Babesia microti</i> , <i>B. divergens</i> , <i>B. venatorum</i> | Babésiose | Animaux d'élevage, chevreuils, rongeurs, tiques | Depuis l'hôte, co-feeding, trans-stadiale, trans-ovarienne | (Kjemtrup and Conrad 2000; Abbas et al. 2014; Herwaldt et al. 2003; Duh, Petrovec, and Avsic-Zupanc 2005; Siński et al. 2006) |

6.3 - Transmission des pathogènes par les tiques

Au cours du long repas sanguin effectué par les tiques, les agents pathogènes sont transmis via la salive de la tique dans le système sanguin des hôtes. Le délai entre le début du repas sanguin et la contamination salivaire varie selon les pathogènes. Concernant la transmission des *Borrelia* et le risque de développer la maladie de Lyme, une étude de 2014 montre que pour un attachement inférieur à 48h, les risques d'être infecté par les bactéries sont faibles (Cook 2014). Les bactéries se trouvent dans les glandes salivaires de la tique et auront besoin que la prise du repas ait commencé pour leur permettre de se multiplier en quantité suffisante afin d'être ensuite transmise par la salive de la tique et ainsi infecter son hôte (Stanek et al. 2012). L'étude *in-vitro* de la transmission de *Bartonella henselae* par la tique *I. ricinus* a montré que le stimulus de la prise d'un nouveau repas sanguin est nécessaire pour que les bactéries migrent jusqu'aux glandes salivaires. Après leur multiplication dans ces glandes, les bactéries peuvent ensuite être transmises à l'hôte dans un délai de 72h environ après l'attachement de la tique (Cotté et al. 2008). La transmission de protozoaires de type *Babesia* se fera quelques jours après le début du repas de la tique car les protozoaires contenus dans les glandes salivaires ne commencent leur développement qu'au moment du repas sanguin. Lorsque les protozoaires seront sous forme de sporozoïtes, soit au bout de 3 à 5 jours d'attachement, l'infection de l'hôte pourra avoir lieu (Kjemtrup and Conrad 2000). Au contraire, la transmission des virus conservés également au sein des glandes salivaires, dont celui de l'encéphalite à tiques, peut être réalisée sans délais dès que la tique commence à se nourrir (Mansfield et al. 2009).

Des études concernant le taux de présence des pathogènes de l'Homme dans les tiques montrent que leur prévalence va varier en Europe, selon le type de microorganisme. Une méta-analyse effectuée en 2005 (110 études menées en Europe dans 21 pays de 1986 à 2003) a montré que le taux d'infection moyen des tiques *I. ricinus* aux bactéries *Borrelia burgdorferi* est d'environ 13,6% (Rauter and Hartung 2005) et de 1 à 20% par les bactéries *Anaplasma phagocytophilum* (Stuen, Granquist, and Silaghi 2013b). D'autre part, une étude menée en Allemagne par Hartelt *et al.*, sur un échantillon

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

d'environ 3 000 tiques, montre que le taux de présence de *Babesia* est de 1% au sein des tiques échantillonnées, dont 90 % des protozoaires détectés appartenant à l'espèce *Babesia divergens* (Hartelt et al. 2004).

6.4 - Maladies diagnostiquées chez l'Homme

L'incidence des maladies transmises à l'Homme par les tiques *I. ricinus* est en augmentation depuis ces dernières années (CDC 2018, 2000; Semenza and Menne 2009). Les nymphes ont la meilleure probabilité pour transmettre des pathogènes à l'Homme, en réussissant à se nourrir sans être détectée. Comme elles ne mesurent que quelques millimètres, leur détection est difficile, comparé aux adultes qui sont de taille plus importante et donc qui peuvent être détectés et retirés potentiellement plus tôt que les nymphes (Swanson et al. 2006). Depuis quelques années, les maladies transmises par les tiques sont prises plus sérieusement en compte car, grâce à leur description et leur étude, elles sont mieux diagnostiquées. Par exemple en France, l'encéphalite à tiques est devenue depuis mai 2021 une maladie à déclaration obligatoire (ou MDO) dans le but de « surveiller et prévenir les risques d'épidémies ». Cette surveillance est réalisée grâce au recueil des données concernant ce virus, transmises par les médecins, les biologistes, les inspecteurs de la santé publique, et les collaborateurs des agences régionales de santé (ARS), (Santé-Publique-France 2021). D'après le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ou ECDC), le nombre de cas diagnostiqués d'encéphalite à tiques a augmenté de 400% en 30 ans en Europe, en prenant en compte toutes les souches virales confondues (ECDC 2017). Au sujet de la maladie de Lyme, d'après le ministère français de la santé, et suite à une étude menée de 2009 à 2019 (réseau sentinelle), l'incidence de la maladie de Lyme est en moyenne de 59 cas / 100 000 habitants, avec un maximum d'environ 69 000 cas diagnostiqués en 2018 (Santé publique France, février 2021), (Septfons et al. 2019). Aux Etats-Unis, une étude concernant des militaires travaillant sur la base de West Point (Etat de New York) a montré que le nombre de cas de maladie de Lyme était élevé sur la période 2016 à

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

2018 (292 cas / 100 000 personnes par an). Dans cette étude le nombre de cas diagnostiqués ont également été répertoriés pour les personnels et accompagnants non militaires, avec un taux d'incidence de 581 cas / 100 000 personnes par an. La forte incidence auprès des civils s'explique par le fait que les militaires sont mieux équipés (tenues et équipements traités contre les vecteurs de maladies) et informés sur les tiques et les maladies transmises par les tiques (Schubert and Melanson 2019). En France, un plan d'action national pour lutter contre la maladie de Lyme a été débuté en 2016. Il vise à soutenir la prévention, les diagnostics, les traitements mis en place contre cette maladie, ainsi que la recherche (Santé 2016). En effet, des données épidémiologiques montrent que l'Est de la France est la région la plus touchée (Alsace, Franche-Comté), en lien avec les pays frontaliers l'Allemagne, l'Autriche, et la République Tchèque, où une forte incidence des maladies transmises par les tiques est présente (Kollaritsch et al. 2011; Li et al. 2019).

7 - Effets du changement climatique sur l'environnement et l'activité de la tique *Ixodes ricinus*

Dans une revue datant de 2006, les effets du changement de température annuelle avaient été décrits comme impactant les tiques. En effet, les températures nocturnes et hivernales ont augmenté proportionnellement plus vite que les températures diurnes et celles des autres saisons (Easterling et al. 1997; Beniston et al. 1998). De plus, le début du printemps a été décalé de 2 semaines environ au niveau Européen (Smithson 2002). Ces modifications de températures ont un impact positif sur le développement de la végétation au cours de l'année ainsi que sur la chaîne trophique du milieu, donc sur les hôtes potentiels de la tique (Lindgren et al. 2006). Dans une autre étude, l'effet du climat au niveau de la survie de la tique a été étudié et modélisé par Jaenson et Lindgren (2011). Cette modélisation suggère que les changements prédits vont induire une augmentation de la répartition de la tique *I. ricinus* qui est infectée par des pathogènes, car la présence d'une végétation abondante

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

accueillant les hôtes « réservoirs » va jouer un rôle dans l'augmentation de la densité et du nombre de tiques infectées (Jaenson and Lindgren 2011). En accord avec ces modélisations, des modifications de la répartition des tiques ont été reportées dans différentes régions de la Suède. Ainsi, les populations d'*I. ricinus* se sont fortement développées dans la région centrale (présence de l'espèce par rapport à la surface totale de la région étudiée de 33% en 1990 à 97% en 2008) et du sud de la Suède (augmentation de 15% en 1990 à 90% en 2008). De plus des tiques sont maintenant présentes dans la région du nord de la Suède (avec une augmentation de 9,5% à 73%). Les fortes densités de populations de tiques seraient en lien avec un environnement propice à leur développement (près des côtes, des rivières) dans le centre et le sud, ou à un climat doux et une végétation adaptée dans les régions du nord (Jaenson et al. 2012). Une telle modification de la répartition des tiques en lien avec le réchauffement climatique est également observée dans les montagnes de République Tchèque où l'altitude maximale de présence des tiques *I. ricinus* est passée de 700 m dans les années 1980 à 1100 m d'altitude dans les années 2000 (Daniel et al. 2003). Des travaux menés dans les Alpes Italiennes ont pu établir la présence d'*I. ricinus* à 1450 m d'altitude lors d'une étude en 2011 (Pintore et al. 2015). De plus, une étude plus récente a permis la détection de tiques jusqu'à 1800 m d'altitude pour des spécimens immatures et jusqu'à environ 1700 m d'altitude pour des tiques adultes (Garcia-Vozmediano et al. 2020). Pour conclure, le changement climatique induisant un adoucissement des températures, et un effet positif sur la végétation et les populations d'hôtes dans les milieux, participe au développement des populations de tiques. En effet, cela permet de développer leur répartition géographique, d'augmenter la densité de leurs populations ainsi que le taux d'infection des tiques qui peut induire un plus fort taux de transmission de zoonoses à l'Homme.

8 - Effets des activités humaines sur le risque de rencontrer des tiques dans l'environnement

La modification des paysages par l'Homme a un impact sur les microclimats ainsi que sur les populations présentes dans les écosystèmes (Medlock et al. 2013). Par exemple dans le cas du développement de monocultures, les tiques ne sont pas dans un environnement propice à leur survie mais les populations d'hôtes tels que les rongeurs y sont favorisés. De plus, la présence de grands troupeaux peut également favoriser les populations de tiques, leur offrant un plus grand nombre d'hôtes concentrés dans un même lieu (L'Hostis et al. 1996; Boyard et al. 2007a). En effet, les terres agricoles peuvent être définies comme un milieu où la rencontre des tiques avec les animaux d'élevages, la faune sauvage et l'Homme peut avoir lieu. Cette intersection peut donc jouer un rôle majeur dans l'épidémiologie des maladies transmises par les tiques (Boyard et al. 2007a; Knap and Avsic-Zupanc 2015). En parallèle, l'abandon des anciennes terres agricoles dans les pays de l'Europe centrale et de l'Est ont créé des modifications significatives des paysages. Par exemple, le développement de population de rongeurs infectés par des pathogènes et d'autres animaux sauvages, et la chute de l'utilisation de pesticides ont permis de favoriser le développement des tiques ainsi que la transmission du virus TBE dans plusieurs pays (Lituanie, Lettonie, Estonie, République Tchèque, Slovénie, Hongrie, Pologne et Slovaquie), (Šumilo et al. 2008). La reforestation et la conservation des espaces naturels boisés possède un impact positif direct sur le développement des tiques car cela permet de créer des habitats favorables à leur survie quand elles sont en phase libre ainsi que le développement des populations d'hôtes sauvages (Šumilo et al. 2008; Randolph et al. 2008). On peut également parler de la fragmentation des habitats (création de patches d'environnements différents) qui va jouer sur les populations vivant dans ces milieux modifiés. Malgré des effets divers sur les espèces présentes, la création de bordures à l'interface des différents milieux est bénéfique pour les populations de tiques (Pfäffle et al. 2013) et pour la dispersion des pathogènes présents dans les hôtes et les tiques (Mechai et al. 2018). Les modifications de ce type permettent

Introduction : Les tiques, un problème de santé mondial

d'augmenter la prédation et également le parasitisme (Pfäffle et al. 2013). Toutes ces modifications de paysages possèdent des effets multiples, pouvant être positifs ou négatifs sur les différents types d'organismes étudiés, comme les tiques, les hôtes et les pathogènes (Medlock et al. 2013). Majoritairement, lorsque le développement des populations d'hôtes est favorisé, cela contribue également au développement de populations de tiques infectées et au risque qu'elles transmettent des maladies à l'Homme.

La modification des zones d'habitations humaines (expansion de l'urbanisme et du péri-urbanisme) entraîne une superposition des milieux de vie avec celui des tiques et donc une plus forte probabilité de rencontre entre le parasite et l'Homme (Honig et al. 2019). Lorsque des espèces hôtes des tiques s'adaptent à la cohabitation avec l'Homme (présence de nourriture toute l'année, abris, etc.), cela peut augmenter les contacts des parasites avec les humains (Pfäffle et al. 2013). Les squares et les parcs dans les zones urbaines contribuent également au maintien des populations de tiques, notamment *I. ricinus* qui peut facilement parasiter les populations de hérissons (décrit comme réservoir aux *Borrelia*, *Anaplasma*, et au TBEv), (Pfäffle et al. 2011; Skuballa et al. 2012; Skuballa et al. 2010). Pour finir, les températures généralement plus élevées en ville contribuent également aux modifications des périodes d'activités et du cycle de développement des tiques ; ainsi les parasites se nourrissent plus facilement, se développent plus rapidement et sont proportionnellement plus infectées, augmentant donc le risque de transmission de pathogènes aux humains (Pfäffle et al. 2013). Pour finir, les variations des conditions météorologiques influencent le comportement récréatif de l'Homme. Ainsi les modifications du climat le rendant favorable aux activités récréatives en extérieur, telles que les sorties dans la nature, augmente également le risque d'exposition aux piqûres de tiques infectées (Jaenson 1991; Kaiser 1995; Jongejan and Uilenberg 2004).

Chapitre 2 : Utilisation des pesticides dans la lutte contre les tiques

1 - Lutte chimique pour la protection des élevages

La première transmission d'un parasite protozoaire (*Babesia bigemina*) par un arthropode, la tique *Rhipicephalus annulatus*, a été décrite aux Etats-Unis en 1893 (Uilenberg 2006). A la même période des traitements sous forme de « bain détiqueurs » à base d'arsenic sont mis en place, principalement dans les pays tropicaux (Australie, Afrique) puis au niveau des Etats-Unis dans les années 1910 (George, Pound, and Davey 2004). De nos jours, de nouvelles classes de pesticides sont utilisées pour le contrôle des tiques au sein des élevages, comme les pyréthriinoïdes de synthèse (*e.g.*, deltaméthrine, perméthrine), les formamidines (*e.g.*, l'amtiraze), les phénylpyrazoles (*e.g.*, le fipronil) et les lactones macrolytiques (*e.g.*, l'ivermectine). Ces nouveaux pesticides, développés à partir des années 1970, sont utilisés pour remplacer les anciennes molécules grâce à leur faible toxicité supposée pour les mammifères et leur plus forte capacité biocide (Guerrero et al. 2014). Dans un premier temps, ils étaient appliqués par bain ou en pulvérisation, puis des formulations permettant une application cutanée, au niveau dorsal sont développées et mises sur le marché (Hamel 1987). L'utilisation du fipronil, du fluazuron et de l'ivermectine s'est quant à elle développée dans les années 1980 à 1990 (George, Pound, and Davey 2004). Les derniers traitements mis en place pour contrer le développement de résistance dans les populations de tiques sont à base de spinosad (George, Pound, and Davey 2004).

Les traitement anti-tiques sont généralement réalisés de façon systématique sur les troupeaux pour empêcher les tiques de venir parasiter les animaux au moment où l'activité des parasites est la plus forte dans l'année, puis de façon régulière suivant la stratégie de l'éleveur (éradiquer complètement les parasites ou juste empêcher l'infestation). Par exemple, l'utilisation de

Introduction : Utilisation des pesticides dans la lutte contre les tiques

pyréthrinoïdes en application cutanée est réalisée afin de prévenir la fixation des tiques, ou encore l'installation de pédiluves contenant des acaricides pour retirer les tiques accrochées aux pattes des animaux qui rentrent de pâturages (Stachurski and Lancelot 2006). La technique de l'injection sous-cutanée d'ivermectine est également employée par certains vétérinaires. Elle permet de traiter les parasites endosymbiotiques. La recherche d'un système permettant la diffusion du composé actif pour empêcher les tiques de se fixer pendant plusieurs jours voire semaines est encore en cours, plusieurs approches sont testées encore de nos jours comme des colliers ou des boucles d'identification contenant des acaricides (George, Pound, and Davey 2004; Kelly et al. 2014).

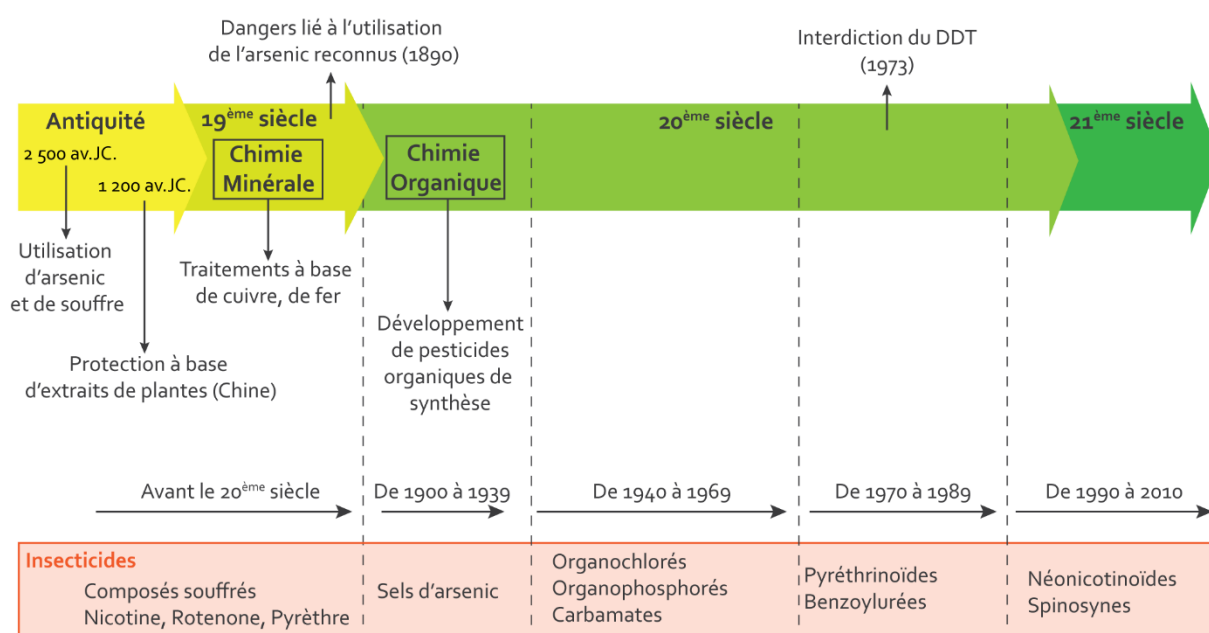


Figure 6 : Historique de l'évolution des principales familles de pesticides, de l'antiquité à nos jours. (Liste non-exhaustive), (Casida and Quistad 1998; Le Goff and Giraud 2019).

2 - Protection de l'Homme contre les tiques

2.1 - Protection par application de répulsifs chimiques

La protection des humains contre les arthropodes vecteurs de maladies correspond majoritairement à une protection chimique. Actuellement des produits ciblés contre les tiques se développent pour prévenir la transmission de maladies (Bissinger and Roe 2010). Dans le cas de la protection individuelle contre les tiques, l'utilisation de produits de type répulsifs est largement répandue et particulièrement efficace (Diaz 2016). Les répulsifs utilisés peuvent être d'origine naturelle et extraits de plantes ou bien synthétisés en laboratoire. Plusieurs molécules décrites comme répulsives sont commercialisées et leur mode d'action général passe par la perturbation du système olfactif des arthropodes (Dethier, Browne, and Smith 1960). Le choix du répulsif utilisé sera effectué en fonction de la population ciblée (âge, allergies, grossesse) et aussi du type d'activité en extérieur correspondant à la période à risque (durée d'efficacité, activités prévues suite à l'application, effet de transpiration, chaleur, etc.), (Pages et al. 2014; Bissinger and Roe 2010). Les répulsifs recommandés par la communauté Européenne (Directive 98/8) sont des molécules d'origine synthétiques telles que le DEET (ou N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide), l'IR3535 (ou butylacétylamino propanoate d'éthyle), l'icaridine (appelée aussi picaridine ou KBR 3023) ou encore d'origine végétale comme le PMD (p-menthane-3,8-diol) ou la perméthrine (maintenant synthétisée en laboratoire, **Tableau 2**), (Pages et al. 2014). De plus, le DEET est un répulsif connu et largement utilisé pour lutter contre les tiques, ainsi il est souvent utilisé comme contrôle positif lors d'études visant à tester de nouvelles molécules répulsives (Buchel et al. 2015; Soutar, Cohen, and Wall 2019). Mais malgré leur autorisation sur le marché et leur efficacité avérée, le mode d'action des répulsifs utilisés n'est pas toujours bien défini, voire inconnu comme pour l'IR3535 ou la picaridine. Les cibles potentielles sont des récepteurs impliqués dans l'olfaction des arthropodes (Staub et al. 2002; Drakou et al. 2017). Certains répulsifs ont montré des effets indésirables chez des personnes traitées, comme

Introduction : Utilisation des pesticides dans la lutte contre les tiques

pour le DEET. Des cas d'intoxications ont été répertoriés (potentiellement lié à un surdosage du produit ou à son ingestion) chez des personnes traitées avec du DEET dont certains présentaient des problèmes au niveau du système nerveux central (Diaz 2016). Également, l'utilisation de PMD (provenant parfois d'extrait d'huiles essentielle) peut entraîner des irritations au niveau cutané et au niveau des yeux et est déconseiller à l'utilisation pour les femmes enceintes et les enfants en bas-âge (Diaz 2016; Pages et al. 2014).

Une autre méthode de protection individuelle utilise l'imprégnation des textiles avec des molécules ayant un effet répulsif, comme la perméthrine. Cette molécule, appartenant à la famille des pyréthrinoïdes, est extraite de fleurs du pyrèthre de Dalmatie (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Cette substance active est commercialisée depuis les années 1970 et a montré qu'en plus de son effet répulsif, elle possède des propriétés acaricides (Katz, Miller, and Hebert 2008). D'après une étude de 2014, la forte toxicité de la perméthrine sur les tiques de l'espèce *I. ricinus* a été observée comme lors de l'utilisation de perméthrine à 0,25 et 1% où une mortalité de 100% a été constatée à 48h *post*-exposition (Buczek, Bartosik, and Kuczynski 2014). La perméthrine peut être commercialisée sous forme de spray à appliquer sur les vêtements avant de réaliser une sortie dans une zone à risque. Des vêtements peuvent également être vendus en étant déjà imprégnés, notamment pour les tenues de terrain militaires ou pour les autres corps de métier où la rencontre avec les tiques est probable. Ces vêtements permettent une protection d'environ 6 mois, malgré les lavages car la dégradation de la molécule est principalement due aux rayons UV (Bissinger and Roe 2010).

Tableau 2 : Composés (répulsifs et acaricides) actuellement autorisés et utilisés pour se protéger des piqûres de tiques.

| Catégorie | Nom molécule | Cible moléculaire | Méthode d'utilisation | Risques d'utilisation | Références |
|-------------------|--------------|----------------------|-----------------------|---|---|
| Synthétique | DEET | Récepteurs olfactifs | Cutanée | Toxicité, dégradation du plastique, aspect huileux et odeur forte | (Diaz 2016; Przygodzka et al. 2019) |
| | Icaridine | Récepteurs olfactifs | Cutanée | Utilisation déconseillée pour les enfants de moins de 2 ans. | (Drakou et al. 2017; Abdel-Ghaffar, Al-Quraishy, and Mehlhorn 2015; Büchel et al. 2015; Diaz 2016) |
| | Perméthrine | Canaux sodiques | Traitement textile | Non préconisée pour une application cutanée | (Katz, Miller, and Hebert 2008; Faulde, Uedelhoven, and Robbins 2003; Brooke W. Bissinger 2010; Faulde, Albiez, and Nehring 2010) |
| | IR 3535 | Récepteurs olfactifs | Cutanée | Pas de contre-indication | (Semmler et al. 2011; Goodyer et al. 2010; Staub et al. 2002) |
| Origine naturelle | PMD | Récepteurs olfactifs | Cutanée | Irritant au niveau cutané et fortement irritant pour les yeux | (Goodyer et al. 2010; Diaz 2016; Jaenson, Garboui, and Pålsson 2006; Elmhalli et al. 2009) |

2.2 - Développement de répulsifs à base d'huiles essentielles

Des répulsifs à base d'huiles essentielles (HE) sont également utilisés pour se protéger des tiques (**Tableau 3**). Ce sont des mélanges complexes composés principalement de terpénoïdes (Jaenson, Garboui, and Pålsson 2006; Gardulf, Wohlfart, and Gustafson 2004; Pålsson et al. 2008; Tunón et al. 2006; Thorsell, Mikiver, and Tunon 2006; Del Fabbro 2015; Jaenson, Pålsson, and Borg-Karlson 2005). Les extraits les plus souvent cités dans la littérature sont la citronnelle, le cèdre, l'eucalyptus, le géranium, la menthe, la lavande, le soja, et l'eucalyptus citronné (Bissinger and Roe 2010). Plusieurs études ont mis en évidence l'effet répulsif et toxique de composés présents dans certaines HE. Notamment contre l'espèce *I. ricinus* comme le carvacrol, le thymol (Tabari et al. 2017) ou encore l'eugénol, qui est également décrit comme acaricide chez *Rhipicephalus microplus* et

Introduction : Utilisation des pesticides dans la lutte contre les tiques

Dermacentor nitens (de Monteiro et al. 2012; Brown et al. 1998). De plus au niveau neurologique, l'eugénol a été décrit comme activateur synaptique chez le mollusque *Helix pomatia*, pouvant montrer une potentielle activité neurotoxique de ce composé (Szabadics and Erdélyi 2000). L'utilisation d'HE en combinaison avec des pesticides a déjà montré un effet potentiateur sur l'activité neurotoxiques des pesticides, comme chez le moustique (Tong and Bloomquist 2013; Norris et al. 2019; Norris et al. 2018). Une étude récente de Arafa *et al.*, (2021), a contourné la résistance aux pyréthrinoïdes des tiques *Rhipicephalus annulatus* en testant une formulation composée de deltaméthrine, d'huile essentielle d'eucalyptus et de thym qui permet de réduire de 95 % l'infestation par les tiques sur une période de 30 jours post-traitement (Arafa et al. 2021).

De manière générale, les formulations à base d'huiles essentielles sont mieux acceptées par la population comme alternative aux substances synthétisées en laboratoire. Malgré tout l'utilisation des huiles essentielles doit être réalisée en prenant des précautions car ces composés extraits de plantes peuvent eux aussi avoir des effets indésirables, notamment chez l'enfant en bas-âge et chez la femme enceinte. En effet, certaines huiles essentielles sont décrites comme étant irritantes pour la peau, les yeux (Jaenson, Garboui, and Pålsson 2006; Gardulf, Wohlfart, and Gustafson 2004; Del Fabbro 2015), ou encore cancérigènes (**Tableau 3**), (Tunón et al. 2006; Thorsell, Mikiver, and Tunon 2006).

Introduction : Utilisation des pesticides dans la lutte contre les tiques

Tableau 3 : Liste non exhaustive des huiles essentielles étudiées pour lutter contre les tiques, ainsi que les composés présents dans ces huiles en particulier.

| Nom scientifique (végétaux utilisés) | Nom commun | Composés et extraits testés | Toxicité | Référence | |
|--------------------------------------|---------------------|-------------------------------|---|---|---|
| <i>Artemisia abrotanum</i> | Aurone | Eugenol | Irritant pour les yeux et la peau, mutagène, tumorigène | (Tunón et al. 2006) | |
| | | Coumarin | Mutagène, tumorigène, tératogène | | |
| <i>Dianthus caryophyllum</i> | Œillet | B-Citronellol | Irritant pour la peau | | |
| | | Eugenol | Irritant pour la peau, mutagène | | |
| | | 2-Phenylethanol | Irritant pour les yeux et la peau, mutagène, troubles de la reproduction, tumorigène, perturbation du système nerveux central | | |
| | | Coumarin | Mutagène, tumorigène, tératogène | | |
| <i>Convallaria majalis</i> | Muguet | Huile extraite | Toxique pour la peau (Citronellol) | | (Thorsell, Mikiver, and Tunon 2006) |
| <i>Cymbopogon spp</i> | Citronnelle | Huile extraite | Irritant pour les yeux, mutagène | | |
| <i>Syzygium aromaticum</i> | Giroflier | Huile extraite | Mutagène, irritant/toxique pour la peau | | |
| <i>Corymbia citriodora</i> | Eucalyptus citronné | Citridiol | Irritant pour la peau et les yeux (modéré) | | (Jaenson, Garboui, and Pålsson 2006; Gardulf, Wohlfart, and Gustafson 2004) |
| <i>Ocimum basilicum</i> | Basilic | Eugenol | Irritant pour la peau | (Del Fabbro 2015) | |
| <i>Pelargonium graveolens</i> | Géranium | Huile extraite (diluée à 30%) | Pas d'information | (Jaenson, Garboui, and Pålsson 2006) | |
| <i>Lavandula angustifolia</i> | Lavande | Huile extraite (diluée à 30%) | Pas d'information | | |
| <i>Rhododendron tomentosum</i> | Lédon des marais | Huile extraite | Pas d'information | (Jaenson, Pålsson, and Borg-Karlson 2005) | |
| <i>Tanacetum vulgare</i> | Tanaïsie commune | 4-Terpineol | Pas d'information | (Pålsson et al. 2008) | |
| | | 1,8-Cineol (eucalyptol) | | | |
| | | Thujone | | | |
| | | 1- α -Terpineol | | | |
| | | Verbenol | | | |
| | | 1-Verbenone | | | |
| | | Borneol | | | |

2.3 - Développement de phénomènes de résistances

L'utilisation de ces différentes molécules montrent que les tiques sont capables de développer des mécanismes de résistances, notamment vis-à-vis des pyréthrinoïdes (**Tableau 4**). L'utilisation globale et généralisée des mêmes acaricides, ou des composés ayant les mêmes cibles au niveau du système nerveux de la tique, pose le problème de la montée des phénomènes de résistance (Abbas et al. 2014). De plus, l'arrivée sur le marché de nouveaux agents chimiques est fortement impactée par le coût de développement de nouvelles molécules. Ce coût est estimé à 100 millions \$US sur une période d'environ 10 ans (Graf et al. 2004). Ces phénomènes de résistance sont plus étudiés chez les tiques du genre *Rhipicephalus* car ils se développent plus rapidement auprès des espèces possédant un cycle à un seul hôte obligatoire (comme *R. microplus*), contrairement aux tiques possédant un cycle à plusieurs hôtes obligatoire (comme *I. ricinus*), (Mekonnen et al. 2002).

Tableau 4 : Premières apparitions de résistances chez la tique *R. microplus* présente dans les élevages. Rc : récepteur, GABA : acide γ -aminobutyrique, AChE : acétylcholinestérase, (Guerrero et al. 2014; Abbas et al. 2014).

| Composés | Cible / Effet | Introduction | Résistance constatée | Pays (résistance observée) |
|---------------------------------------|----------------------------------|--------------|----------------------|------------------------------|
| Arsenic | Stress oxydant (arsénié) | 1893 | 1936 | Australie, Argentine |
| Organochlorés (DDT) | Antagonistes des Rc GABA | 1946 | 1953 | Argentine, Brésil, Venezuela |
| Organophosphorés/ Carbamates | Inhibiteur d'AChE | 1944 | 1963 | Australie |
| Formamidines (amitrazé) | Agonistes des Rc à l'octopamine | 1975 | 1978 | Australie |
| Pyréthrinoïdes | Modulateurs des canaux sodiques | 1997 | 1981 | Australie |
| Lactones macrocycliques (ivermectine) | Activateurs des canaux chlorures | 1981 | 2000 | Colombie |
| Phénylpyrazoles (Fipronil) | Antagonistes des Rc GABA | 1993 | 2013 | Mexique |
| Benzoylurées (Fluazuron) | Inhibiteur de croissance | 1994 | 2014 | Brésil |
| Spinosyn (Spinosad) | Agonistes des nAChRs | 2007 | Non décrite | |

3 - Utilisation des pesticides ciblant les récepteurs nicotiniques

3.1 - Utilisation de ces composés dans la lutte contre les tiques

L'utilisation des néonicotinoïdes pour lutter contre les tiques est mise en place dans les traitements antiparasitaires chez les animaux. Certains traitements ne sont pas ciblés contre les tiques mais sont appliqués dans le but de déparasiter les animaux contre plusieurs espèces (tiques, puces, mouches, moustiques), comme le produit Vectra® composé de dinetofuran, et utilisés pour le traitement des chats et des chiens (Coudert 2019). L'utilisation de néonicotinoïdes pour la protection des animaux de compagnie s'effectue souvent à l'aide de mélange de substances actives comme les traitements à base de 10 % d'IMI (10%) et de 4,5 % de fluméthrine (Serestro®), (Dantas-Torres et al. 2013; Stanneck and Fourie 2013).

Peu de travaux de recherche ont été effectués sur l'utilisation de composés ciblant les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) pour la lutte contre les tiques. Pourtant elle est la seule classe de pesticides utilisées ne montrant pas de développement de résistance actuellement, par exemple le spinosad (George, Pound, and Davey 2004). De plus, leur utilisation est moindre par rapport aux autres classes d'acaricides comme les pyréthrinoïdes, les carbamates ou encore les organophosphorés, utilisés largement pour le traitement systématique des troupeaux. Une étude de 2015 portant sur le pouvoir acaricide du dinetofuran sur des femelles adultes gorgées (*R. sanguineus*) a montré un effet acaricide lent et graduel (de Oliveira et al. 2015). En effet, une faible mortalité n'est constatée qu'à partir de 5 000 ppm et augmente graduellement avec la concentration en dinetofuran (LC₅₀ = 10 182,25 ppm), (de Oliveira et al. 2015). Comme les tiques sont devenues résistantes à toutes les substances fortement utilisées (George, Pound, and Davey 2004), il est nécessaire de développer ou d'exploiter de nouvelles molécules qui soient spécifiques des tiques, avec des cibles moléculaires différentes.

3.2 - Néonicotinoïdes et autres composés ciblant les récepteurs nicotiniques

Les pesticides ciblant les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotiniques (nAChRs) et qui sont les plus utilisés dans le monde sont les néonicotinoïdes (représentant 18% du marché global des insecticides), suivis par les spinosynes (2,8%) d'après une étude de 2016 (Crossthwaite et al. 2017). D'autres classes existent comme les sulfoximines (sulfoxaflor), les buténolides (flupyradifurone) ou encore les analogues de la néréistoxine, qui ont également une action sur les nAChRs des invertébrés (Sparks and Nauen 2015; Sparks et al. 2013; Nauen, Jeschke, Velten, Beck, Ebbinghaus-Kintscher, et al. 2015; Lee, Tomizawa, and Casida 2003) .

Les pesticides de la famille des néonicotinoïdes sont des dérivés de la nithiazine, décrite comme un insecticide très efficace mais photo-instable. Le processus de modification de cette molécule a mené au remplacement de son groupe nitrométhylène en nitroimine supplémenté d'un groupement 1-chloro-3-pyridyl. Le résultat de ces modifications fut l'obtention d'une nouvelle substance biocide, l'imidaclopride (ou IMI), (Kagabu 2003). L'IMI est largement utilisée dans la protection des cultures car elle possède un pouvoir biocide important, notamment sur les insectes piqueur-suceurs. Les molécules synthétisées les années suivantes ont été regroupées en trois classes en fonction des modifications réalisées sur la structure initiale de la nithiazine : les nitrométhylènes ($C=CH-NO_2$), les N-nitroguanidines ($C=N-NO_2$) et les N-Cyanoamidines ($C=N-CN$), (**Figure 7**), (Jeschke and Nauen 2008; Kagabu 2003; Matsuda et al. 2001). Les groupements portés par les substances ont montré une différence au niveau de l'efficacité des pesticides. En effet, l'IMI, la clothianidine (CLT) et le thiaméthoxame (TMX) portent un groupement nitro induisant une toxicité plus importante que les molécules avec un groupement cyano, comme l'acétamipride (ACE) ou le thiaclopride (THC), (Matsuda et al. 2001; Pisa et al. 2015). Ces pesticides sont décrits avec une demi-vie relativement longue dans le sol (entre 8 et > 1000 jours), ainsi qu'une grande solubilité dans l'eau

Introduction : Utilisation des pesticides dans la lutte contre les tiques

en fonction des composés étudiés (Hladik, Main, and Goulson 2018; Bonmatin et al. 2015). Malgré l'effet toxique plus faible des néonicotinoïdes par rapport aux organophosphorés ou aux organochlorés sur les espèces non-cibles et l'environnement (Tomizawa and Casida 2005), leur impact toxique global est à prendre en considération. Des évaluations au niveau européen et par l'ANSES en France ont notamment fortement restreint l'utilisation des pesticides néonicotinoïdes. L'ANSES, qui est chargée d'évaluer les autorisations de mises sur le marché en France, a émis des recommandations pour l'utilisation de certains néonicotinoïdes ayant des impacts sur le comportement des abeilles. Notamment en 2016, où l'agence a recommandé une modification des conditions d'utilisations de plusieurs composés (clothianidine, thiaméthoxame et imidaclopride), pour lesquels une incertitude importante existait au niveau de leurs usages (ANSES 2021). Ensuite, entre 2018 et 2019, l'usage des substances suivantes : clothianidine, imidaclopride, thiaméthoxame et thiaclopride, a été interdit par la commission européenne, à l'exception de leur utilisation sous serre (ANSES 2021). En effet, de nombreuses publications ont montré les impacts de ces pesticides sur des espèces non-cibles comme les insectes pollinisateurs, ou encore sur un grand nombre d'espèces vertébrés (Goulson 2013; Gibbons, Morrissey, and Mineau 2015).

Parmi les autres classes de pesticides agissant sur les nAChRs d'invertébrés, les sulfoximines (**Figure 7**) sont utilisés pour lutter contre les insectes se nourrissant de sève (Babcock et al. 2011), comme *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Bemisia tabaci* ou encore *Nilaparvata lugens* qui sont également des espèces connues pour avoir développé des résistances pour les autres insecticides présents sur le marché (Bass et al. 2015). Dans cette nouvelle classe de pesticide, le sulfoxaflor a été commercialisé en tant que composé initial des sulfoximines (Sparks et al. 2013). La distinction structurale principale avec les néonicotinoïdes est la présence d'un groupement sulfoximine, pour la première fois utilisée dans l'agrochimie (Babcock et al. 2011).

Un autre exemple est le flupyradifurone (**Figure 7**), commercialisé depuis 2014 (Nauen, Jeschke, Velten, Beck, Ebberinghaus-Kintscher, et al. 2015; Sparks and Nauen 2015), qui représente une

Introduction : Utilisation des pesticides dans la lutte contre les tiques

nouvelle classe chimique décrite comme agoniste des nAChRs. Il est principalement utilisé comme insecticide systémique pour la protection des cultures d'arbres fruitiers contre les ravageurs de cultures. Ce composé est structurellement proche des néonicotinoïdes (notamment de l'IMI) et possède le même mode d'action (Nauen, Jeschke, Velten, Beck, Ebbinghaus-Kintscher, et al. 2015). Le flupyradifurone est capable de moduler l'activité des nAChRs au niveau du site de liaison orthologue des nAChRs, il est décrit comme un agoniste partiel (Nauen, Jeschke, Velten, Beck, Ebbinghaus-Kintscher, et al. 2015). Ces deux composés, le sulfoxaflor et le flupyradifurone, sont avantageux car ils ne créent pas de résistance croisée qui pourrait avoir lieu chez des espèces résistantes à certains néonicotinoïdes, comme *M. persicae* dont une mutation sur la sous-unité β_1 (R81T) induit une insensibilité à l'IMI (Bass et al. 2011).

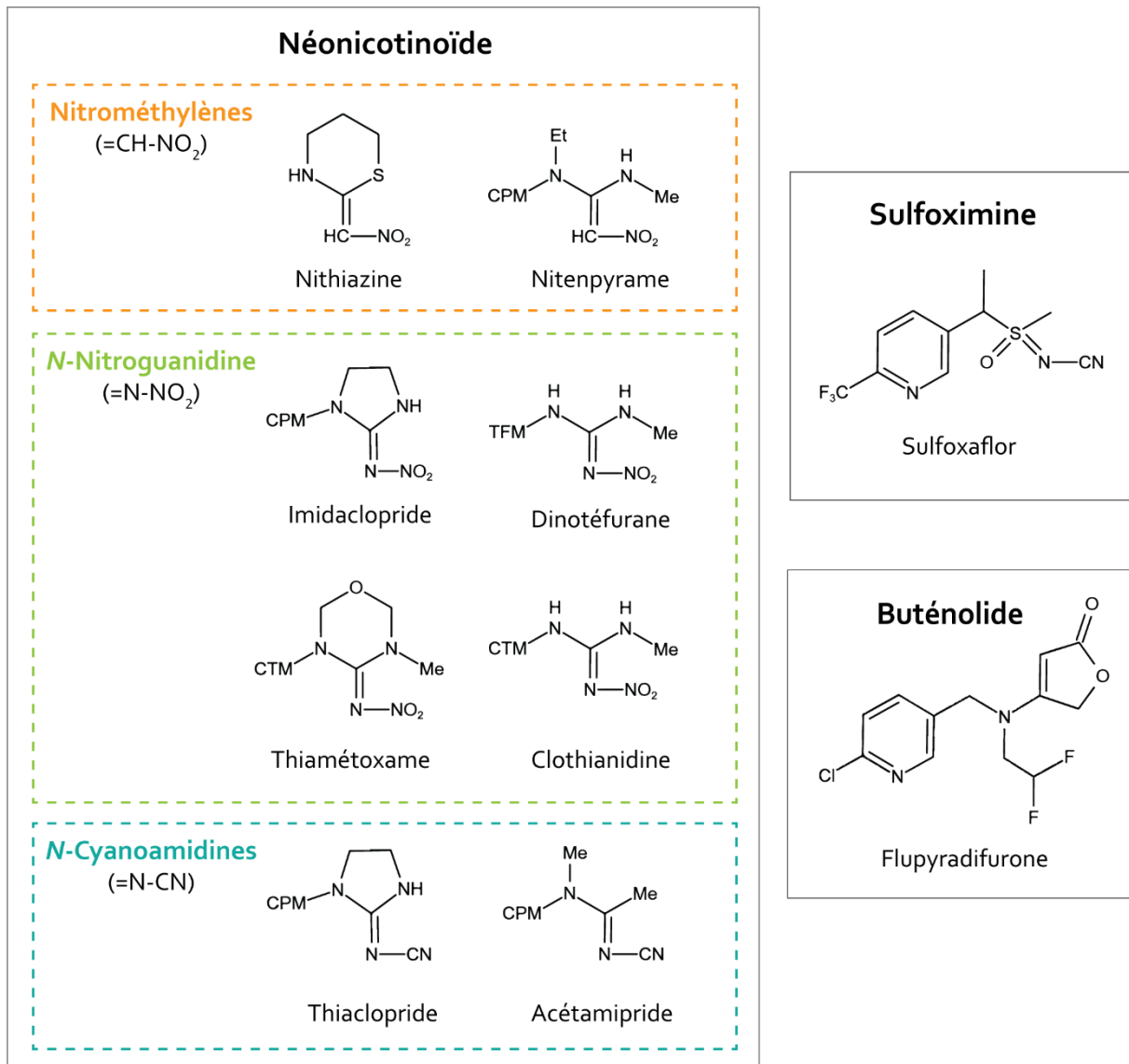


Figure 7 : Représentation des structures d'insecticides néonicotinoïdes classés en fonction des modifications présentes sur les structures, ainsi que la structure du sulfoxaflor et du flupyradifurone. CPM (6-chloropyrid-3-ylmethyl), TFM (tetrahydrofurylmethyl), CPM (6-Chloro-pyrid-3-ylmethyl).

Chapitre 3 : Le récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

1 - Description des nAChRs chez les vertébrés

1.1 - Généralités sur les récepteurs canaux activés par un ligand

Les récepteurs de type canal activés par un ligand (ou LGIC : « Ligand-Gated Ion Channel »), sont des protéines transmembranaires polymériques. Ce type de récepteur est activé suite à la liaison d'un ligand endogène au niveau d'un site de liaison extracellulaire. Les LGICs sont impliqués dans la neurotransmission rapide au niveau synaptique. Ils sont définis comme des canaux ionotropes car leurs protéines transmembranaires permettent le passage des ions au travers de la membrane plasmique. Ce groupement de récepteurs canaux se divise en quatre superfamilles (**Figure 8**) :

- Les récepteurs à boucle cystéine (ou « Cys-LGIC »), qui est la superfamille la plus diversifiée et qui contient des récepteurs composés de 5 sous-unités comme les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotiques (nAChRs), les récepteurs au GABA_A (γ-aminobutyrique), les récepteurs à la sérotonine de type 5-HT (5-hydroxytryptamine), et les récepteurs à la glycine (Connolly and Wafford 2004).
- Les récepteurs glutamates NMDA (N-méthyl-D-aspartate), AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid) et kaïnate (Connolly and Wafford 2004).
- Les récepteurs canaux TRP (Transient Receptor Potential), qui sont des canaux perméables aux cations souvent impliqués dans la nociception, et peuvent être activés par différentes voies dont celle impliquant un ligand (Ramsey, Delling, and Clapham 2006).
- Les récepteurs canaux ATP dépendants activés lorsqu'il y a une augmentation de l'ATP au niveau extracellulaire, impliquant des canaux potassiques ATP-dépendants (Vial, Roberts, and Evans 2004).

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

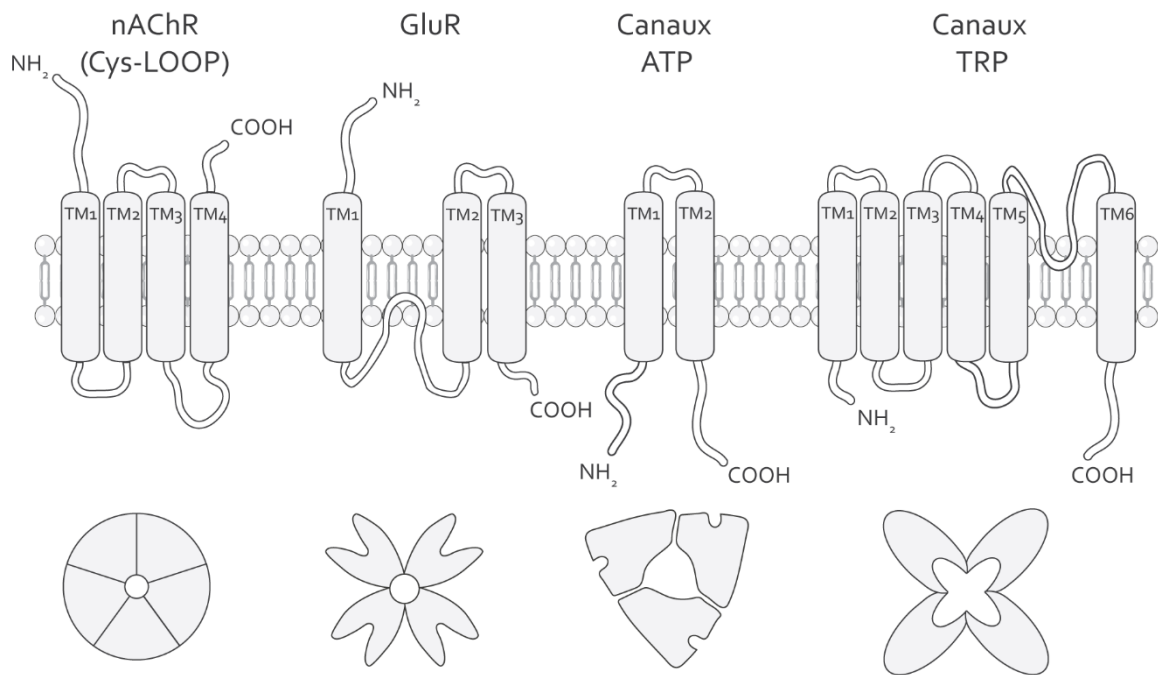


Figure 8 : Structure des quatre superfamilles de récepteurs composants les LGICs.

Représentation des sous-unités en coupe dans la membrane (en haut), et des sous-unités assemblées vu du dessus (en bas.). Les récepteurs appartenant aux Cys-LGIC sont représentés par l'exemple du nAChR. Les récepteurs au glutamate (GluR), les canaux ATP (Adénosine Tri-Phosphate) et TRP (Transient Receptor Potentiel) sont également représentés. Les différentes grandes familles sont caractérisées par le nombre de domaines transmembranaires présents et leur agencement dans la membrane, ainsi que le nombre de sous-unités assemblées formant le récepteur, (Collingridge et al. 2009; Boonen et al. 2018).

1.2 - Découverte des récepteurs nicotiques

Les premières expériences concernant l'activité des récepteurs à l'acétylcholine de type nicotiques ont été réalisées par le Pr. John Newport Langley durant le début du 20^{ème} siècle. Lors d'expériences menées sur des grenouilles, il a en effet observé la contraction du muscle gastrocnémien suite à l'application de nicotine, qui pouvait être inhibée par l'application de curare (Langley 1905). Dans la continuité de ces travaux, Henry Hallet Dale et son équipe ont proposé l'action d'un neurotransmetteur pour activer les récepteurs neuronaux et ils réussirent à purifier l'acétylcholine (ACh). Dans la suite de leurs travaux, ils ont comparé les effets de l'ACh, de la nicotine

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

et de la muscarine, et ont conclu à la présence de deux familles de récepteurs possédant des propriétés pharmacologiques différentes (Dale 1914; Dale and Dudley 1929). Actuellement, ces deux familles de récepteurs cholinergiques sont décrites comme les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (ou nAChR) et de type muscarinique (ou mAChR). Grâce à toutes ces découvertes concernant le rôle de l'acétylcholine au sein du système nerveux central des vertébrés, les chercheurs Henry H. Dale et Otto Loewi reçurent le Prix Nobel de Physiologie et Médecine en 1936 pour « *leurs découvertes relatives à la transmission chimique de l'influx nerveux* ». Les propriétés fonctionnelles du nAChR ont ensuite été étudiées par les chercheurs Katz et Miledi dans les années 1970. Leurs travaux portaient sur « *le rôle du calcium dans la facilitation neuromusculaire* » (Katz and Miledi 1968). En effet, ils avaient observé que lors de l'activation des récepteurs, la dépolarisation de la membrane plasmique était observée suite à l'entrée de calcium extracellulaire à travers celle-ci. Par la suite, des études menées dans l'équipe de Erwin Neher et Bert Sakmann ont permis d'obtenir les premiers courants grâce à la technique de patch-clamp, sur des membranes de fibres musculaires de grenouille (Neher, Sakmann, and Steinbach 1978). L'application de cette technique leur a notamment permis d'obtenir le prix Nobel de Médecine en 1991 concernant leurs travaux sur « *la fonction des canaux ioniques individuels dans les cellules* ». La description de la structure du récepteur nicotinique a ensuite été obtenue grâce aux études menées sur l'organe électrique de la torpille (*Torpedo californica*), où les nAChRs sont en quantité très importante. L'équipe de Lee a réussi à caractériser *in-vitro* le récepteur grâce à l'utilisation d'une neurotoxine (α -bungarotoxine) extraite du venin de serpent du genre *Bungarus* (Lee and Tseng 1966). Pour compléter ce résultat, l'utilisation d' α -bungarotoxine sur l'organe de la torpille (*in-vivo*) et en patch-clamp (*in-vitro*) a permis de montrer son effet inhibiteur sur les nAChRs en bloquant la réponse des récepteurs quand ils sont mis en contact d'un agoniste, la carbamylcholine (Changeux, Kasai, and Lee 1970). Grâce à l'extraction des nAChRs présents chez la torpille, le premier récepteur nicotinique a été cloné et caractérisé en système d'expression hétérologue par l'utilisation de la technique de double microélectrode en potentiel imposé (ou TEVC), (Mishina et al. 1986). De plus, ce récepteur a servi de modèle afin d'étudier la structure de nAChRs chez plusieurs espèces de

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

vertébrés et d'invertébrés, ainsi que leur fonction et leur régulation (Osborne 1996; Mongan et al. 1998; Swope et al. 1999).

1.3 - Propriétés structurales et fonctionnelles des nAChRs

1.3.1 - Structure du récepteur et des sous-unités qui le composent

L'étude des récepteurs nicotiques présents dans l'organe électrique de la torpille (*T. marmorata*) par microscopie électronique, à haute résolution (4 Å) a permis de démontrer que leur structure est pentamérique et qu'ils possèdent un diamètre d'environ 80 Å et une hauteur de 160 Å (Unwin 2005; Toyoshima and Unwin 1990). Cette protéine, d'environ 300 kDa, est composée de 5 sous-unités qui sont similaires au niveau de leur structure et donc de leurs dimensions, mesurant au maximum 30 × 40 × 160 Å par sous-unité (**Figure 9**), (Unwin 2005). L'assemblage de ces sous-unités forme un pore au travers de la membrane plasmique, à l'intérieur duquel peuvent passer des ions lorsque le canal est ouvert. Chaque sous-unité possède la même structure tridimensionnelle, avec une partie intracellulaire (composée d'hélices α) mesurant environ 60 Å, un domaine transmembranaire d'environ 30 Å et une partie extracellulaire (composée de feuillets β) mesurant environ 70 Å (**Figure 9**), (Albuquerque et al. 2009). Toutes les sous-unités sont constituées d'un domaine hydrophile amino-terminal (ou N-terminal) au niveau extracellulaire (**Figure 10**), contenant la boucle Cys. Cette boucle Cys est un motif composé de deux cystéines séparées de 13 acides aminés et joue un rôle dans l'assemblage et la cinétique d'ouverture du canal des nAChRs. La région N-terminale est impliquée dans la fixation de l'agoniste et est constituée de 6 boucles notées de A à F (Grutter et al. 2005). Les autres caractéristiques structurales présentes dans les sous-unités de nAChRs sont les quatre hélices transmembranaires hydrophobes (du TM₁ au TM₄, **Figure 10**), une large boucle intracellulaire entre les domaines TM₃ et TM₄ (impliquée dans la régulation des nAChRs par phosphorylation), et pour finir un domaine hydrophile carboxy-terminal (ou C-terminal) extracellulaire (**Figure 10**), (Unwin

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

2005). Il existe deux types de sous-unités pouvant composer les récepteurs nicotiniques : les sous-unités dites α ainsi que les non- α . Une sous-unité appartenant au groupe α possède un doublet de cystéines adjacentes (position 192 et 193 chez la torpille), (Albuquerque et al. 2009). Les sous-unités ne possédant pas ce motif appartiennent aux sous-unités dites non- α et sont nommées sous-unités β , δ , γ ou ϵ (Lindstrom 1997).

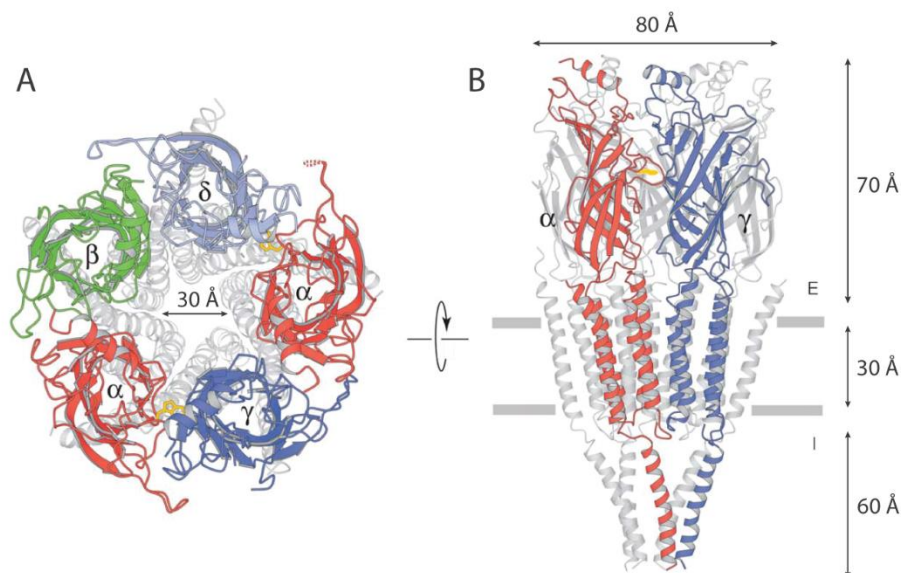


Figure 9 : Représentation en ruban des sous-unités formant le récepteur $(\alpha)_2\beta_1\gamma\delta$ de la torpille.

(A) Le récepteur est vu au-dessus du pore ionique et seulement les parties des sous-unités impliquées dans la formation du pore ionique sont mises en évidence (α : rouge, β : vert, γ : bleu foncé, δ : bleu clair). (B) Le récepteur est vu parallèlement à la membrane plasmique, uniquement les sous-unités positionnées à l'avant du récepteur sont mises en évidence (α : rouge, γ : bleu foncé). L'emplacement du résidu α Trp 149 (jaune, A et B), ainsi que la localisation de la membrane plasmique (barre grise, I : Intracellulaire, E : Extracellulaire, B) sont également représentés. Les différentes dimensions du récepteur sont illustrées par des barres fléchées avec la valeur en Å (modifiée d'après (Unwin 2005)).

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

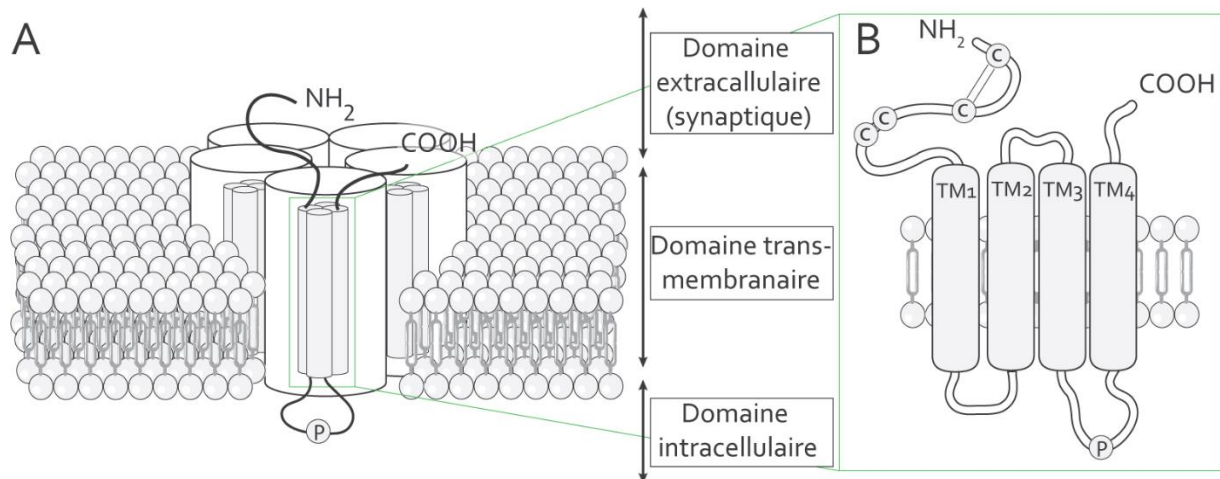


Figure 10 : Représentation de la structure des sous-unités formant les récepteurs nicotiniques.

(A) Assemblage des sous-unités formant un nAChR au niveau de la membrane plasmique, avec les trois domaines décrits (synaptique, transmembranaire, intracellulaire). (B) Représentation schématique des domaines transmembranaires composants une sous-unité du récepteur. Le doublet de cystéines adjacentes (caractéristique des sous-unités de type α) ainsi que les deux cystéines formant un pont disulfure (caractéristique des récepteurs appartenant à la famille des LGIC) sont présents sur la partie N-terminale (modifié d'après (Karlin 2002)).

Les domaines TM2 des sous-unités composant le nAChR délimitent un pore ionique d'environ 30 Å de diamètre (Arias 1997; Unwin 2005). Toutes les sous-unités sont assemblées de façon symétrique, perpendiculaire à la membrane plasmique et suivant un axe qui va passer au centre du pore ionique ainsi créé (Arias 1997). L'étude des séquences protéiques des sous-unités formant le récepteur musculaire (α)₂ $\beta\gamma\delta$ de *T. californica* a permis de déterminer l'emplacement des acides aminés qui vont former des anneaux chargés ou non, présents au niveau du pore ionique du récepteur (Figure 11 A), (Noda et al. 1983). Les récepteurs nicotiniques sont perméables aux cations car l'entrée du pore est constituée d'acides aminés chargés négativement. Ainsi leur activation, entraînant l'ouverture du canal et l'entrée de cations dans le cytoplasme (Na^+ , K^+ et Ca^{2+}), induit une forte dépolarisation de la membrane (Arias, Bhumireddy, and Bouzat 2006). Les anneaux chargés négativement, qui sont présents au niveau extracellulaire et intracellulaire, permettent la sélection des ions pouvant transiter à travers le canal, alors que les anneaux non chargés ont pour fonction l'ouverture et la fermeture du canal (Arias 1997; Karlin 2002). Ces anneaux sont situés en série verticale

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

partant du domaine extracellulaire jusqu'au domaine intracellulaire dans l'ordre suivant : anneau de la leucine (L254), de la valine (V251), de la leucine (L247), de la thréonine (T244) et de la sérine (S240), (**Figure 11A**), (Arias 1997; Itier and Bertrand 2001). La surface interne du canal est constituée en grande partie par le TM2 et une petite partie du TM1 (Karlin 2002). De plus, les TM1, TM3 et TM4 permettent de former une séparation entre le pore ionique et la membrane hydrophobe (Papke 2014). Le TM1 a également une fonction dans l'assemblage des sous-unités donc la formation du canal et son activation, grâce à une interaction avec la partie supérieure du domaine TM2 (Corringer, Novère, and Changeux 2000).

1.3.2 - Site de liaison des ligands

Des études, utilisant des marquages par affinité avec des molécules marquées ou de la mutagenèse dirigée, ont permis de localiser le site de liaison à l'ACh à l'interface entre deux sous-unités sur le domaine extracellulaire (Mishina et al. 1985; Galzi et al. 1991; Galzi et al. 1990; Middleton and Cohen 1991). La sous-unité principale est obligatoirement une sous-unité α et la sous-unité complémentaire, une sous-unité α ou non- α (**Figure 11 B**), (Karlin 2002; Papke 2014; Sine 2002; Albuquerque et al. 2009). La sous-unité principale participe au site de liaison à l'acétylcholine en impliquant le doublet de cystéines de la boucle C (Albuquerque et al. 2009) et également des résidus (en particulier des tyrosines) présents au niveau des boucles A et B (Arias 1997). La sous-unité complémentaire participe au site de liaison avec ses boucles D, E et F (Albuquerque et al. 2009). Le nombre de sites de liaisons présents au niveau extracellulaire est donc défini par la composition en sous-unité du récepteur, pouvant aller de 2 sites distincts pour les récepteurs hétéromériques comme $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$, et jusqu'à 5 sites distincts pour les récepteurs homomériques comme le récepteur α_7 (Gotti et al. 2007; Taly et al. 2009). Le site de liaison formé à l'interface entre les deux sous-unités est une poche hydrophobe. Deux parties composent cette interface, la première dite « positive » est constituée des deux cystéines adjacentes de la sous-unité α (αCys_{192} et αCys_{193}) ainsi que de quatre

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

résidus aromatiques bien espacés au sein de la séquence d'acide aminés (α Tyr 93, α Trp 149, α Tyr 190, et α Tyr 198), (Galzi et al. 1990; Middleton and Cohen 1991). Ces acides aminés sont conservés au sein des sous-unité de type α , à l'exception des sous-unités de type α_5 (α Tyr 190 Asp) avec laquelle aucun site de liaison ne peut donc être formé (Karlín 2002; Taly et al. 2009). La seconde partie dite « négative » est constituée d'au moins trois acides aminés présents sur la deuxième sous-unité composant le site de liaison (Albuquerque et al. 2009; Celie et al. 2004). Des études du récepteur hétéromérique (α_1) $_2\beta_1\gamma\delta$ chez *Torpedo californica* ont montré l'implication de résidus particuliers de la sous-unités complémentaire (Leu 112, Met 114 et Trp 53) dans la formation du site de liaison (Celie et al. 2004). Les résidus présents sur la partie « positive » de la poche hydrophobe vont définir l'affinité avec le ligand alors que les acides aminés de la partie « négative » ont un rôle dans la sélectivité de celui-ci (Albuquerque et al. 2009).

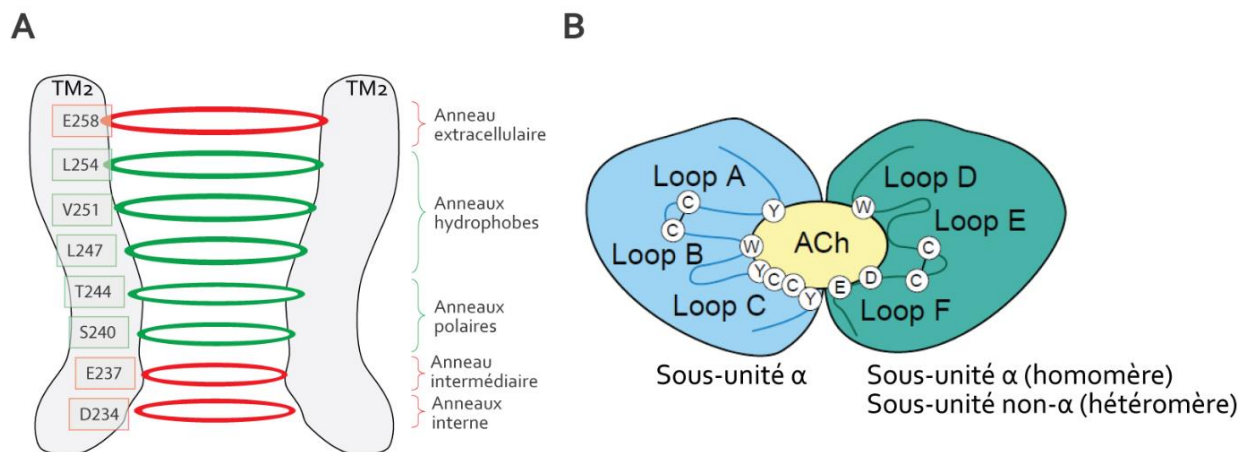


Figure 11 : Représentation (A) des anneaux chargés à l'intérieur du pore ionique ainsi que (B) du site de liaison à l'ACh à l'interface entre une sous-unité α (principale) et complémentaire (α ou β).

(A) Illustration de l'organisation structurale et fonctionnelle du canal ionique entre deux sous-unités de type α , délimité par les domaines TM2 des sous-unités du pentamère. Les résidus notés et numérotés sur le schéma représentent les acides aminés présents au niveau de la lumière du canal et formant des anneaux avec les résidus homologues des autres sous-unités (représentés par les cercles). Les anneaux rouges sont chargés négativement et les anneaux verts sont non-chargés. (B) Illustration du site de liaison à l'ACh à l'interface entre deux sous-unités. Les boucles A, B, et C (Loop A-C) de la sous-unité α sont représentées ainsi que leurs résidus impliqués dans la formation du site de liaison. De même pour la seconde sous-unité, les boucles D, E et F (Loop D-F) sont représentées avec les acides aminés nécessaires à la formation du site de liaison, (modifié d'après (Corringer, Novère, and Changeux 2000; Matsuda et al. 2001; Itier and Bertrand 2001)).

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

Grâce à l'étude d'une protéine se liant à l'ACh (l'ACh-Binding Protein ou AChBP), la résolution atomique structurelle du site de liaison à l'ACh présent sur les nAChRs a été obtenue. Cette protéine provenant du mollusque (découverte chez *Lymnea stagnalis*), (Smit et al. 2001) est sécrétée par les cellules gliales et possède un rôle dans la régulation du signal synaptique au niveau de synapses cholinergiques (Brejc et al. 2001b). Grâce à des études de cristallographie aux rayons X, la structure de l'AChBP a été obtenue chez *Lymnea stagnalis* (**Figure 12**), (Brejc et al. 2001b), et également chez d'autres espèces comme *Aplysia californica* (Hansen et al. 2005), *Capitella teleta* (McCormack et al. 2010) ou encore *Cupiennius salei* (Torkkeli, Liu, and French 2015).

L'AChBP possède une homologie de séquence avec certaines sous-unités de nAChRs comprise entre 20 et 24 % (α_1 , α_4 et β_2 d'humain), (Brejc et al. 2001a). Cette protéine est connue pour avoir une structure homo-pentamérique (**Figure 12**) et possède un site de liaison pour l'ACh similaire à celui présent sur les nAChRs. La plupart des acides aminés conservés et impliqués dans le site de liaison à l'ACh sont également présents dans la séquence de l'AChBP (Shahsavari et al. 2016), ce qui en fait un bon modèle pour l'étude des nAChRs. Deux types d'AChBP ont été comparés lors d'études d'affinité de liaison avec plusieurs agonistes. Les Ls-AChBP (provenant de l'espèce *Lymnaea stagnalis*) montrent un profil d'affinité comparable aux récepteurs nAChRs de type $\alpha_4\beta_2$ car ils sont plus sensibles aux agonistes endogènes et de petites tailles (ACh, nicotine, épibatidine), alors que les Ac-AChBP (*Aplysia californica*) sont plus sensibles aux toxines (conotoxines), (Shahsavari et al. 2016). L'étude en co-cristallographie de la structure des Ls-AChBP a permis de déterminer les résidus impliqués dans la liaison à l'ACh pour la partie « positive » (Trp 53, Tyr 89, Trp 143, Tyr 185 et Tyr 192) qui sont également conservés au sein des nAChRs. Plus généralement, le site à l'interface entre le ligand et le récepteur est formé par les résidus présents dans la boucle D (Trp), la boucle A (Tyr), la boucle B (Trp) et la boucle C (2 Tyr), (Brejc et al. 2001a; Olsen et al. 2014; Corringer, Novère, and Changeux 2000). Au niveau de la partie « négative » de la poche hydrophobe, les résidus impliqués dans la liaison peuvent varier de manière importante en fonction du modèle d'étude (AChBP et nAChR) et

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

également au sein des AChBP provenant d'espèces différentes. Cette diversité est due au rôle de ces résidus dans la sélectivité du ligand (Marotta et al. 2014; Harpsøe et al. 2013). L'étude de cette protéine a permis de caractériser de nombreux sites de liaisons pour des agonistes tels que la nicotine, la carbamylcholine (Celie et al. 2004), ainsi que pour des insecticides comme l'imidaclopride ou la clothianidine (Ihara et al. 2008), ou encore pour des antagonistes tels que la méthyllycaconitine (Hansen et al. 2005).

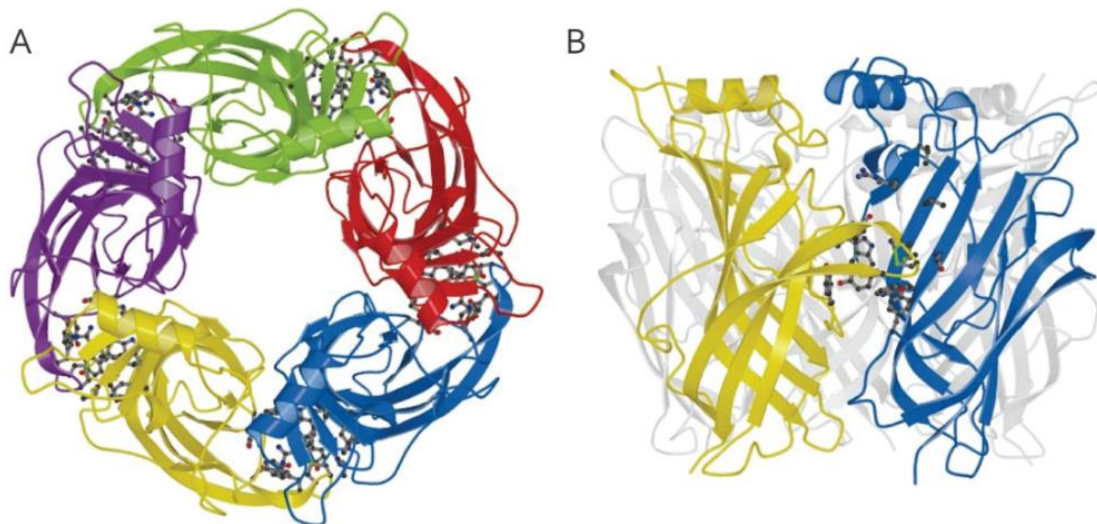


Figure 12 : Représentation en 3D de l'AChBP du mollusque *Lymnaea stagnalis*.

(A) Représentation vue du dessus de la protéine homopentamérique. Chaque sous-unité est représentée avec une couleur différente. Les structures formées de boules et de barres localisées à l'interface entre chaque sous-unité représentent les sites de liaison (B) Vu du pentamère AChBP, perpendiculaire à l'axe formé par l'assemblage des 5 sous-unités. Le site de liaison situé entre les deux sous-unités mises en évidence (jaune et bleue) est visible grâce à la représentation d'un ligand entre les deux sous-unités, (Brejc et al. 2001b).

1.3.3 - Mécanisme d'ouverture du canal

Les nAChRs peuvent passer par trois états différents : l'état fermé (ou au repos) en absence d'agoniste et les états ouvert (ou activé) et désensibilisé en présence d'agoniste (**Figure 13**). Ces états sont définis par la conformation dans laquelle le récepteur va se trouver au niveau de la membrane plasmique (**Figure 13**). Une modification importante se réalise suite à la liaison d'un agoniste et permet l'ouverture du canal qui mène à l'entrée d'ion à travers la membrane plasmique (Sine and Engel 2006). Plusieurs régions et résidus présents au sein des nAChRs et à l'interface entre le site de liaison et le canal sont impliqués dans l'ouverture du pore ionique. En effet, la liaison d'un agoniste va modifier la position de la boucle C (qui va immobiliser l'agoniste) d'une sous-unité α , ce qui entrainera un changement de conformation au niveau des hélices des domaines TM2 et TM3 des sous-unités non- α (Grutter et al. 2005; Unwin and Fujiyoshi 2012). L'état désensibilisé du nAChR apparait suite à une application prolongée d'agoniste, le récepteur n'est alors plus conducteur (Gay and Yakel 2007). Les nAChRs présentant un état de désensibilisation sont encore liés à l'ACh avec une forte affinité mais les courants cationiques engendrés par les récepteurs vont diminuer progressivement car les récepteurs deviennent imperméables aux ions (Sine and Engel 2006). Ensuite le récepteur se retrouve à nouveau dans un état fermé et redevient sensible à la liaison d'un agoniste.

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

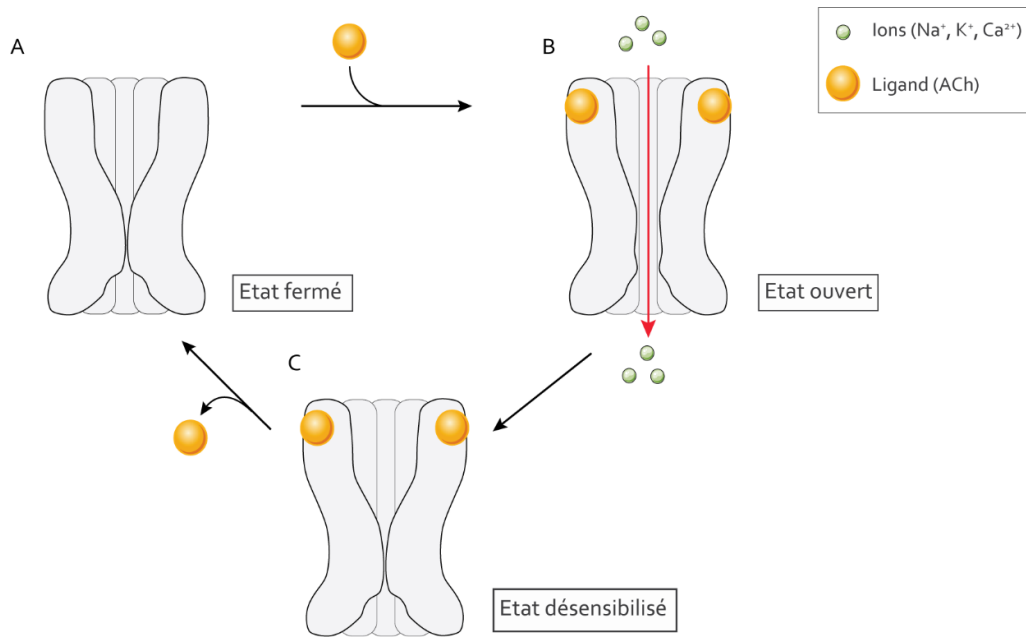


Figure 13 : Illustration des différents états des nAChRs (fermé (A), ouvert (B), désensibilisé (C).

La liaison d'un ligand tel que l'ACh au niveau des sites de liaison présents sur le récepteur nicotinique permet l'ouverture rapide du canal et le passage d'ions à travers le pore ionique. Le récepteur va ensuite se désensibiliser avec les sites de liaisons restant inaccessibles pour d'autres ligands. Lorsque les sites de liaison sont de nouveau accessibles, le récepteur est alors à l'état fermé (ou inactivé), en attente de la fixation de nouveaux ligands (Corradi and Bouzat 2016).

1.4 - Diversité des récepteurs chez les vertébrés

1.4.1 - Identification des différentes sous-unités de nAChRs

Actuellement, 17 sous-unités ont été caractérisées chez les vertébrés, dont cinq sont présentes au niveau musculaire (α_1 , β_1 , γ , δ et ϵ) et douze au niveau neuronal (α_2 - α_{10} et β_2 - β_4), (Albuquerque et al. 2009). Le récepteur formé par les sous-unités peut-être homomérique et donc constitué de sous-unités identiques, ou hétéromérique s'il est composé d'au moins deux types de sous-unités différentes. Deux catégories de récepteurs sont définies en fonction de la localisation des nAChRs : 1) les récepteurs musculaires formés de quatre types de sous-unités différentes (nommées α , β , γ , δ et ϵ , **Figure 14**) selon différentes combinaisons telles que $(\alpha)_2\beta\gamma\delta$ présentes au niveau des

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

tissus musculaires non-innervés, notamment identifiés chez le veau, ou $(\alpha)_2\beta\epsilon\delta$ présentes au niveau des synapses neuromusculaires matures chez l'adulte (Mishina et al. 1986; Albuquerque et al. 2009) ; et 2) les récepteurs neuronaux composés de sous-unités α et β pouvant former des homopentamères ou des hétéropentamères (Role 1992).

Malgré la grande diversité de combinaisons de nAChRs possibles en théorie, un faible nombre de sous-types de récepteurs nicotinique ont été mis en évidence, démontrant ainsi une forte régulation de leur expression (Albuquerque et al. 2009). Les sous-unités α_7 , α_8 et α_9 peuvent former des nAChRs homomériques, mais également des récepteurs hétéromériques fonctionnels en combinaison avec des sous-unités α et β , comme $\alpha_7\beta_3$ étudié suite à l'injection de sous-unités de poulet en ovocyte de xénope ou le récepteur $\alpha_9\alpha_{10}$ provenant du rat (Palma et al. 1999; Elgoyhen et al. 2001). Les récepteurs neuronaux sont également régulés en fonction du type cellulaire où ils sont exprimés. En effet, des ARN messagers (ou ARNm) de nAChRs, en plus des cellules neuronales, ont été détectés dans de nombreux types cellulaires comme des cellules de la peau, des bronches, des cellules épithéliales gastrointestinales ou encore des lymphocytes (Zoli et al. 2018; Kindt et al. 2008). Les nAChRs détectés dans les différents tissus peuvent être homo- ou hétéromériques et également agir indépendamment dans la régulation des processus physiologiques (Gotti et al. 2009; Zoli et al. 2018; Alkondon and Albuquerque 2004).

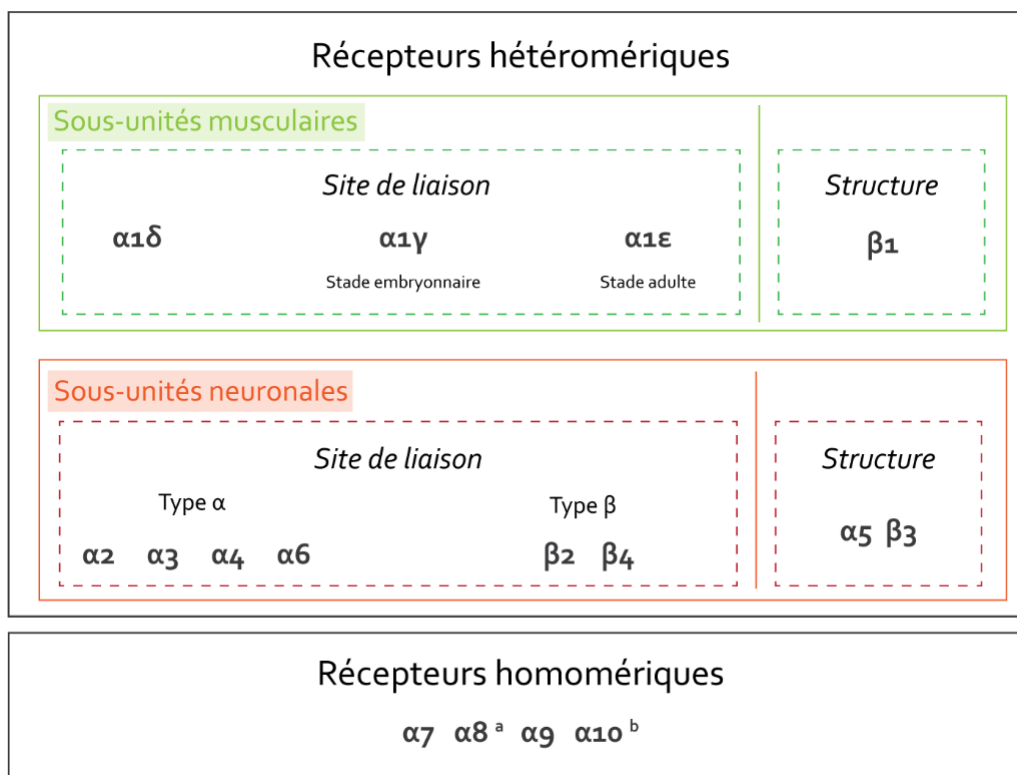


Figure 14 : Diversité des sous-unités de nAChRs présentes chez les vertébrés pouvant former des récepteurs hétéro- ou homomériques.

Les sous-unités présentes dans la case « Site de liaison » sont impliquées dans la formation du site de liaison à l'agoniste au niveau du récepteur (pour les nAChRs hétéromériques et homomériques). ^a la sous-unité $\alpha 8$ a été décrite uniquement chez le poulet. ^b La sous-unité $\alpha 10$ peut former des récepteurs hétéromériques avec la sous-unité $\alpha 9$ (Papke 2014).

1.4.2 - Caractérisation pharmacologique des nAChRs de vertébrés

La composition en sous-unités α et β possède un impact sur la fonction et les propriétés des récepteurs exprimés (Gotti et al. 2009). De plus, la diversité moléculaire est à mettre en parallèle avec une diversité des propriétés pharmacologiques des nAChRs. A ce titre, des études électrophysiologiques ont permis d'identifier différents sous-types de récepteurs en fonction de leurs réponses aux agonistes et antagonistes. Ainsi, l'utilisation d' α -bungarotoxine (α -Bgt) a permis de décrire deux sous-types de récepteurs différents, en fonction de leur sensibilité à cette toxine. Suite à l'étude de récepteurs fonctionnels, les nAChRs homomériques constitués des sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 8$ et $\alpha 9$ ont été décrits comme sensibles à l' α -Bgt (Couturier et al. 1990; Elgoyhen et al. 1994). Également, le

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

récepteur musculaire (α_1)₂ $\beta_1\delta\gamma$, ainsi que les nAChRs hétéromériques neuronaux $\alpha_7\alpha_8$, $\alpha_9\alpha_{10}$ et $\alpha_7\beta_2$ ont été identifiés comme sensibles à l' α -Bgt (Elgoyhen et al. 2001; Zoli, Pistillo, and Gotti 2015; Le Novere, Corringer, and Changeux 2002), (Keyser et al. 1993). Les récepteurs hétéromériques composés des sous-unités α_2 - α_6 et β_2 - β_4 sont quant à eux définis comme insensibles à l' α -Bgt, mais ayant une forte affinité pour la nicotine (Gotti et al. 2009; Zoli, Pistillo, and Gotti 2015). Effectivement, les récepteurs $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_3\beta_2$ et $\alpha_4\beta_2$ ne sont pas bloqués par l' α -Bgt lorsqu'ils sont exprimés en ovocytes de xénope (Wada et al. 1988; Boulter et al. 1987).

En plus de la classification des récepteurs entre sensibles et insensibles à l' α -Bgt, les sous-unités composant les nAChRs peuvent également impacter la pharmacologie des récepteurs. Pour illustrer cela, les études effectuées sur des récepteurs hétéromériques humains ont montré que $\alpha_2\beta_4$ et $\alpha_4\beta_4$ peuvent être inhibés à 80% par la mécamylamine (Mec), comparé aux récepteurs $\alpha_2\beta_2$ et $\alpha_4\beta_2$ qui le sont seulement à 50% (Chavez-Noriega et al. 1997). Par ailleurs, au sein des récepteurs hétéromériques, les sous-unités qui ne sont pas impliquées dans le site de liaison sont appelées « sous-unités accessoires ». Pour l'instant, deux sous-unités accessoires sont décrites : α_5 et β_3 , et sont capables de s'assembler avec les sous-unités α_4 et β_2 pour former les récepteurs $\alpha_4\beta_2\alpha_5$ ou $\alpha_4\beta_2\beta_3$ (Kuryatov, Onksen, and Lindstrom 2008). Ces sous-unités ont un rôle dans la modification des propriétés pharmacologiques des récepteurs. Ainsi, l'étude de l'expression de ces récepteurs dans des cellules HEK (Human Embryonic Kidney) a permis de montrer que le nAChR $\alpha_4\beta_2\alpha_5$ est le plus sensible à la galanthamine. Cela pourrait être dû à la présence de la sous-unité α_5 dans le récepteur fonctionnel (Kuryatov, Onksen, and Lindstrom 2008). La stœchiométrie peut aussi moduler les propriétés des nAChRs hétéromériques. Des études réalisées sur des récepteurs composés des sous-unités α_4 et β_2 ont permis d'identifier deux assemblages possibles, le récepteurs $(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$ et $(\alpha_4)_3(\beta_2)_2$. Leur expression en cellules HEK a montré que les nAChRs $(\alpha_4)_3(\beta_2)_2$ sont plus sensibles à l'ACh et plus perméables au calcium (Nelson et al. 2003; Moroni et al. 2006).

1.5 - Modulation allostérique des nAChRs

La modulation allostérique des récepteurs est définie par le fait qu'un ligand va induire un changement de conformation du récepteur en se liant à un site dit « allostérique », qui est un site distinct du site de liaison à l'ACh appelé orthostérique (Bertrand and Gopalakrishnan 2007). L'étude de la modulation des nAChRs par ce type de composé a été développée dans le but de trouver des traitements contre des maladies touchant le système nerveux central (SNC) comme la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie, ou encore la dépression (Taly et al. 2009). Différents types de ligands ont la capacité de moduler la réponse des nAChRs suite à la fixation d'un agoniste (**Tableau 5**), que l'on peut classer en trois catégories :

- Des molécules activatrices des récepteurs comme les modulateurs positifs allostériques (ou PAM pour « *Positive Allosteric Modulator* »).
- Des molécules inhibitrices comme les modulateurs négatifs allostériques (ou NAM pour « *Negative Allosteric Modulator* »).
- Des molécules qui vont se lier aux nAChRs mais dont la liaison ne va engendrer aucune réponse fonctionnelle, ils sont appelés modulateurs allostériques silencieux (ou SAM pour « *Silent Allosteric Modulator* »).

Les modulateurs allostériques positifs (ou PAM) vont avoir un effet positif sur la réponse engendrée par la liaison d'un agoniste au niveau du site orthostérique du nAChR. On distingue les PAM de type I, qui vont augmenter le pic de réponse sans impacter l'état de désensibilisation du récepteur, et les PAM de type II qui ont un effet sur l'état des récepteurs et peuvent donc inhiber l'état de désensibilisation, c'est-à-dire permettre le passage direct des nAChRs à l'état activé (Wang and Lindstrom 2018). Le premier PAM décrit pour le récepteur homomérique $\alpha 7$ de mammifère est l'ivermectine. Une application de l'ivermectine en pré-traitement entraîne une augmentation du courant induit par l'ACh et une réduction de l'EC₅₀ (concentration efficace médiane ou « half maximal

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

effective concentration ») ainsi que du temps de désensibilisation des récepteurs (Krause et al. 1998). Plusieurs autres PAM ont par la suite été caractérisés comme le 5-Hydroxyindole (type I), le NS-1738 (type I), le TQS (type II) ou le PNU-120596 (type II) (**Tableau 5**) pour lesquels le pouvoir de modulation positive varie de manière importante entre les molécules. Par exemple, l'application de PNU-120596 (10 μ M) permet d'obtenir des réponses à l'ACh 10 fois supérieures au contrôle (ACh seule), comparé à l'application de 1 mM de 5-Hydroxyindole qui n'augmente qu'avec un facteur 5 (Bertrand and Gopalakrishnan 2007).

Les modulateurs négatifs (ou NAM) sont décrits comme des inhibiteurs non-compétitifs des nAChRs et peuvent être classés en deux catégories : les NAM qui vont se lier au niveau du pore ionique et ainsi bloquer l'entrée des ions dans le canal, et ceux qui ont un effet modulateur sur les propriétés du récepteur comme la désensibilisation et le retour à l'équilibre des nAChRs (Chatzidaki et al. 2015). De nombreux ligands ont été identifiés comme des molécules psychoactives telles que la mécamylamine, des antidépresseurs, des monoterpènes (le menthol ou le camphre) ou encore des ligands endogènes telle que la protéine Lynx-1 (Chatzidaki et al. 2015).

Les modulateurs allostériques silencieux (ou SAM) vont se lier aux nAChRs sur des sites allostériques utilisés pour la majorité des PAM et NAM, et n'induire aucune modulation de la réponse à l'agoniste lié au site orthostérique. Récemment, l'impact des SAM sur les modulations allostériques des PAM et des NAM a été décrite. En effet, la présence de composés appartenant aux SAM (2,3,5,6MP-TQS et 2,4,6MP-TQS) inhibe l'effet de modulation de type NAM ou PAM sur la réponse à l'ACh appliqués sur un récepteur $\alpha 7$ humain (Gill-Thind et al. 2015; Chatzidaki et al. 2015).

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

Tableau 5 : Liste de modulateurs allostériques des récepteurs nicotiques (non-exhaustive).

| Composés | Récepteurs étudiés | Espèces | Type de modulation | Références |
|--|---------------------------------|----------------|--------------------|--|
| 17 β -estradiol | $\alpha 2\beta 4$ | Humain | PAM* | (Jin and Steinbach 2011) |
| 4BP-TQS | $\alpha 7$ | Humain | PAM II | (Grønlien et al. 2007) |
| 5-hydroxyindole | $\alpha 7$ | Humain | PAM I | (Zwart et al. 2002) |
| A-867744 | $\alpha 7$ | Humain | PAM II | (Faghieh et al. 2009) |
| CCMI | $\alpha 7$ | Rat | PAM I | (Ng et al. 2007) |
| Galantamine | $\alpha 4\beta 2$ | Humain | PAM* | (Samochocki et al. 2003) |
| | $\alpha 6\beta 4$ | Humain | | |
| | $\alpha 3\beta 4$ | Humain | | |
| Genistein | $\alpha 7$ | Humain | PAM I | (Grønlien et al. 2007) |
| HEPES | $\alpha 4\beta 2$ | Humain | PAM* | (Weltzin, Huang, and Schulte 2014) |
| | $\alpha 7$ | Humain | | |
| Ivermectine | $\alpha 7$ | Humain, poulet | PAM* | (Krause et al. 1998) |
| Levamisole | $\alpha 3\beta 3$ | Humain | PAM* | (Levandoski, Picket, and Chang 2003) |
| | $\alpha 3\beta 4$ | Humain | | |
| LY-2087101 LY-2087133 LY-1078733 | $\alpha 7$ (humain) | Humain | PAM I | (Broad et al. 2006) |
| | $\alpha 2\beta 4$ (humain) | Humain | | |
| | $\alpha 4\beta 2$ (humain) | Humain | | |
| | $\alpha 4\beta 4$ (humain) | Humain | | |
| NS-1738 | $\alpha 7$ (humain) | Humain | PAM I | (Timmermann et al. 2007) (Olsen et al. 2013) |
| | $\alpha 4\beta 2$ (humain) | Humain | | |
| NS-206 | $\alpha 4\beta 2$ (humain) | Humain | PAM* | (Olsen et al. 2013) |
| NS9283 (A-969933) | $\alpha 4\beta 2$ (humain) | Humain | PAM* | (Lee et al. 2011) |
| PNU-120596 | $\alpha 7$ (humain) | Humain | PAM II | (Hurst et al. 2005) |
| RO5126946 | $\alpha 7$ (humain) | Humain | PAM I | (Sahdeo et al. 2014) |
| TBS-346 | $\alpha 7$ (humain/rat) | Humain, rat | PAM I | (Chatzidaki and Millar 2015) |
| TBS-516 | $\alpha 7$ (humain/rat) | Humain, rat | PAM II | (Chatzidaki and Millar 2015) |
| Mécamylamine | $\alpha 3\beta 4$ (humain, rat) | Humain, rat | NAM | (Papke, Sanberg, and Shytle 2001) |
| | $\alpha 3\beta 2$ (humain, rat) | Humain, rat | | |
| | $\alpha 7$ (humain, rat) | Humain, rat | | |
| | $\alpha 4\beta 2$ (humain, rat) | Humain, rat | | |
| Menthol | $\alpha 7$ (humain) | Humain | NAM | (Ashoor et al. 2013) |
| Propofol | nAChRs natifs | Torpedo | NAM | (Jayakar et al. 2013) |
| Zinc | $\alpha 7$ (poulet) | Poulet | NAM | (Palma et al. 1998) |
| 2,3,5,6MP-TQS | $\alpha 7$ (humain) | Humain | SAM | (Gill-Thind et al. 2015) |
| 2,4,6MP-TQS | | Humain | | |

* Le type de modulateur allostérique n'est pas précisé dans l'étude.

2 - Diversité moléculaire des nAChRs chez les arthropodes

2.1 - Diversité génétique des sous-unités de nAChRs d'arthropodes

La première séquence de nAChRs d'insecte a été clonée chez la drosophile *Drosophila melanogaster*. En effet, l'hybridation avec des sondes ADN provenant de la torpille a permis d'isoler la première séquence d'une sous-unité β_1 de nAChR d'insecte (Hermans-Borgmeyer et al. 1986). Le séquençage et l'annotation du génome de *D. melanogaster* (Adams et al. 2000) a permis l'identification de 10 gènes codant pour des sous-unités différentes de nAChRs, dont 7 sont des sous-unités α et 3 sont des sous-unités β (Jones and Sattelle 2010). Suite aux études menées sur la drosophile, d'autres espèces d'insectes d'intérêt ont été étudiées, menant à l'identification de 10 à 12 gènes codant pour des sous-unités de nAChRs (Jones and Sattelle 2010), comme chez le moustique *Anopheles gambiae* vecteur de la malaria (α_1 -9 et β_1), (Jones, Grauso, and Sattelle 2005a), l'abeille domestique *Apis mellifera* (α_1 -9 et β_1 et β_2), (Jones et al. 2006), ou encore *Bombyx mori* (α_1 -9 et β_1 -3), (Shao, Dong, and Zhang 2007) et *Tribolium castaneum* (α_1 -11 et β_1), (Jones and Sattelle 2007). La nomenclature universelle des sous-unités de nAChRs d'insecte est définie en fonction de l'homologie avec les séquences des sous-unités de la drosophile *D. melanogaster*. Ainsi 7 groupes monophylétiques de sous-unités ont été définis : les groupes Dmel α_1 , Dmel α_2 , Dmel α_3 , Dmel α_4 , Dmel α_5 -7, Dmel β_1 , et Dmel β_2 . Les sous-unités dont les séquences présentent moins de 29 % d'homologie avec les séquences de la drosophile sont dites « divergentes ». L'identification de ces sous-unités divergentes spécifiques est possible pour les espèces dont le génome est séquencé et annoté (**Tableau 6**), (Jones and Sattelle 2010).

Les récepteurs nicotiniques appartenant à des espèces d'Arachnides ont également été étudiés (

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

Tableau 6), notamment chez *Tetranychus urticae*, un acarien se nourrissant sur les plantes (Dermauw et al. 2012; Grbić et al. 2011) ou chez l'araignée *Pardosa pseudoannulata* (Meng et al. 2015a). La caractérisation de récepteurs chez les tiques, des espèces d'intérêt au niveau médical et vétérinaire, a également été débutée, permettant d'obtenir des séquences prédites et partielles de sous-unités de nAChRs notamment chez *Ixodes scapularis* (vecteur de la maladie de Lyme), (Gulia-Nuss et al. 2016) ou encore chez *Rhipicephalus sanguineus* (parasite des élevages dans les régions tropicales), où la sous-unité α_1 a été étudiée (Lees et al. 2014).

Tableau 6 : Récapitulatif des espèces d'arthropodes dont l'étude du génome (du transcriptome pour *P. pseudoannulata*) a été réalisée et dont les sous-unités de nAChRs ont été décrites (liste non exhaustive).

| Ordre | Espèces | Importance | Nombre de sous-unités | Sous-unités divergentes | Références |
|--------------------|--------------------------------|--|-----------------------|--|--|
| <i>Diptera</i> | <i>Drosophila melanogaster</i> | Modèle génétique | 10 | β_3 | (Jones and Sattelle 2010) |
| <i>Diptera</i> | <i>Anopheles gambiae</i> | Vecteur de la Malaria | 10 | α_9 | (Jones, Grauso, and Sattelle 2005a) |
| <i>Lepidoptera</i> | <i>Bombyx mori</i> | Modèle lépidoptères, production de soie | 12 | $\alpha_9, \beta_2, \beta_3$ | (Shao, Dong, and Zhang 2007) |
| <i>Hymenoptera</i> | <i>Apis mellifera</i> | Modèle en comportement, pollinisation | 11 | α_9, β_2 | (Jones et al. 2006) |
| <i>Hymenoptera</i> | <i>Nasonia vitripennis</i> | Modèle guêpe parasitoïde | 16 | $\alpha_9, \alpha_{10}, \alpha_{11}, \alpha_{12}, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ | (Jones et al. 2010) |
| <i>Coleoptera</i> | <i>Tribolium castaneum</i> | Modèle coléoptères, ravageur d'aliments entreposés | 12 | α_9, α_{10} | (Jones and Sattelle 2007) |
| <i>Orthoptera</i> | <i>Locusta migratoria</i> | Modèle criquet | 11 | α_9, β_2 | (Wang et al. 2015) |
| <i>Homoptera</i> | <i>Acyrtosiphon pisum</i> | Ravageur de culture | 11 | $\alpha_9, \alpha_{10}, \beta_2$ | (Dale et al. 2010) |
| <i>Blattodea</i> | <i>Periplaneta americana</i> | Modèle en électrophysiologie | 19 | $\alpha_9, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6, \beta_7, \beta_8, \beta_9, \beta_{10}$ | (Jones et al. 2021) |
| <i>Acari</i> | <i>Ixodes scapularis</i> | Vecteur de la maladie de Lyme | 12 | Non décrites | (Gulia-Nuss et al. 2016) |
| <i>Acari</i> | <i>Tetranychus urticae</i> | Ravageur de cultures | 10 | β_2, β_3 | (Dermauw et al. 2012; Grbić et al. 2011) |
| <i>Araneae</i> | <i>Pardosa pseudoannulata</i> | Biocontrôle | 8 | Non décrites | (Meng et al. 2015a) |

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

2.2 - Multiplicité des sous-unités de nAChRs chez les arthropodes

2.2.1 - Mécanisme d'édition de l'ARN messenger

Le mécanisme d'édition de l'ARNm permet la modification de certains nucléotides, comme la transformation d'une adénosine (A) en une inosine (I). Cette modification est réalisée par des enzymes appelées les adénosines désaminases qui agissent sur l'ARNm (ADARs). Les nucléotides I sont affiliés à des guanosines (G) dans la machinerie cellulaire. Ainsi, les transcrits ayant subi ce type de modification auront une séquence différente comparée à l'ADN génomique, permettant la traduction de différentes isoformes de la protéine (Seeburg 2002). Chez les insectes, de telles modifications ont été détectées préférentiellement dans le système nerveux chez les individus adultes chez *D. melanogaster*, mais également chez *A. mellifera* (Jones et al. 2006; Palladino et al. 2000). Chez *D. melanogaster*, cinq sous-unités sont concernées par l'édition des ARN, induisant des modifications d'acides aminés présents dans des régions fonctionnelles. Par exemple les sous-unités Dmel α ₅, Dmel α ₇ et Dmel β ₂ peuvent comporter des modifications sur leurs domaines TM₂, TM₃ et TM₄ par édition. De telles modifications pourrait induire des changements au niveau de l'assemblage du récepteur ou au niveau fonctionnel, par exemple au niveau de l'activation et de la régulation du temps d'ouverture du canal (Guzmán et al. 2003; Tamamizu et al. 1999). De la même façon, des modifications des sous-unités Dmel α ₆ et Dmel β ₁ sont rapportées au niveau de la partie N-terminale (extracellulaire) impactant les boucles impliquées dans la liaison avec le ligand et le domaine TM₂ (Grauso et al. 2002; Hoopengardner et al. 2003). Également, une modification de 5 résidus proche de la boucle E de la sous-unité α ₆ est observée chez d'autres espèces d'insectes, notamment chez *Musca domestica*, *B. mori*, *H. viriscens*, et *T. castaneum* (Gao, Deacutis, and Scott 2007; Jin et al. 2007). Un phénomène d'édition plus large de la sous-unité α ₆ est observée chez l'abeille *A. mellifera*, où 9 résidus sont modifiés (Jones et al. 2006). Cette modification serait impliquée dans l'altération de la désensibilisation du récepteur et sa conductance, ainsi que dans sa maturation (Jin et al. 2007; Gao,

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

Deacutis, and Scott 2007; Jones et al. 2006). Au contraire, chez *A. gambiae* aucune modification post-transcriptionnelle n'a été observée. Ainsi ces éditions de séquences peuvent permettre la formation de nAChRs qui sont espèces-spécifiques (Jones, Grauso, and Sattelle 2005b).

2.2.2 - Mécanismes d'épissage alternatif

L'épissage alternatif est un processus permettant l'obtention de plusieurs ARNm correspondant à des protéines distinctes, qui proviennent toutes d'une séquence génomique unique. Il existe cinq mécanismes principaux d'épissage alternatif (**Figure 15 A**): (1) le saut d'exon, (2) la reconnaissance d'un site d'épissage alternatif à l'intérieur des exons au niveau 5' ou (3) à l'extrémité 3' des séquences, (4) la rétention d'intron, et (5) l'épissage d'exons mutuellement exclusifs (obtention d'une séquence épissée contenant l'un ou l'autre des exons), (Keren, Lev-Maor, and Ast 2010).

La sous-unité α_4 de la drosophile possède deux exons, exon 4 et exon 4', qui sont soumis à un épissage alternatif mutuellement exclusif (**Figure 15 B**). Ce mécanisme conduit à trois isoformes différentes (avec soit un des exons 4 ou 4', soit une absence de l'exon 4), présentant une modification de la séquence au niveau de la boucle Cys de la sous-unité. Il a également été décrit que les sous-unités portant l'exon 4' ont un plus faible succès de formation de nAChRs fonctionnels (Lansdell and Millar 2000a). Trois isoformes de la sous-unités α_4 ont également été identifiées chez *A. mellifera* avec une régulation de leur expression au cours du développement. En effet, l'isoforme comprenant l'exon 4 est présent à tous les stades développement contrairement à celui possédant l'exon 4' qui n'a été détectée qu'aux stades de pupes et d'adulte, suggérant un rôle dans l'assemblage de récepteurs impliqués dans le développement tardif des organismes (Jones et al. 2006). La régulation de ces mécanismes d'épissage alternatif peut donc fortement impacter les propriétés pharmacologiques et l'expression des nAChRs. Un autre mécanisme d'épissage très conservé chez plusieurs espèces d'arthropodes concerne les exons 3 et 8 de la sous-unité α_6 . L'abeille *A. mellifera* et la drosophile *D.*

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

melanogaster ont trois exons 8 alternatifs (notés exon 8a, 8b et 8c) alors que le moustique *A. gambiae* et le papillon *B. mori* en possèdent uniquement deux (Jones et al. 2006; Jin et al. 2007). Chez *D. melanogaster* ainsi que *A. gambiae*, l'exon 3 possède deux formes alternatives, contrairement à *A. mellifera* n'en possédant qu'une seule (Jones, Grauso, and Sattelle 2005b; Jones et al. 2006; Grauso et al. 2002). Certains mécanismes d'épissage sont donc spécifiques à une espèce. Ainsi chez *B. mori* l'épissage alternatif de la sous-unité $\alpha 8$ au niveau des TM₂ et TM₃ (exon 7a et 7b) entraîne une modification fonctionnelle du récepteur au niveau du canal (motif GEK) qui peut perturber la sélectivité cationique (Shao, Dong, and Zhang 2007). Les variants d'épissage peuvent également conduire à des modifications des mécanismes de régulation intracellulaire de l'activité des nAChRs. Chez *A. mellifera*, la sous-unité $\alpha 3$ présente un variant avec une délétion de 13 acides aminés au niveau de la boucle intracellulaire entre les domaines TM₃ et TM₄, provoquant la perte de deux domaines de phosphorylation pour la séquence dite « courte ». Cette différence au niveau des deux séquences épissées pourrait jouer un rôle dans les phénomènes d'agrégation, de désensibilisation des récepteurs et de modulation de l'effet des pesticides (Thany et al. 2007). L'épissage peut conduire à l'expression de protéines tronquées non fonctionnelles dont l'expression *in-vivo* reste à étudier. Le rôle hypothétique de ces formes tronquées dans les organismes serait de capter les molécules d'ACh en excès (si leur site de liaison à l'ACh reste intact) pour éviter une surexcitation du système nerveux des insectes (Jones and Sattelle 2010).

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

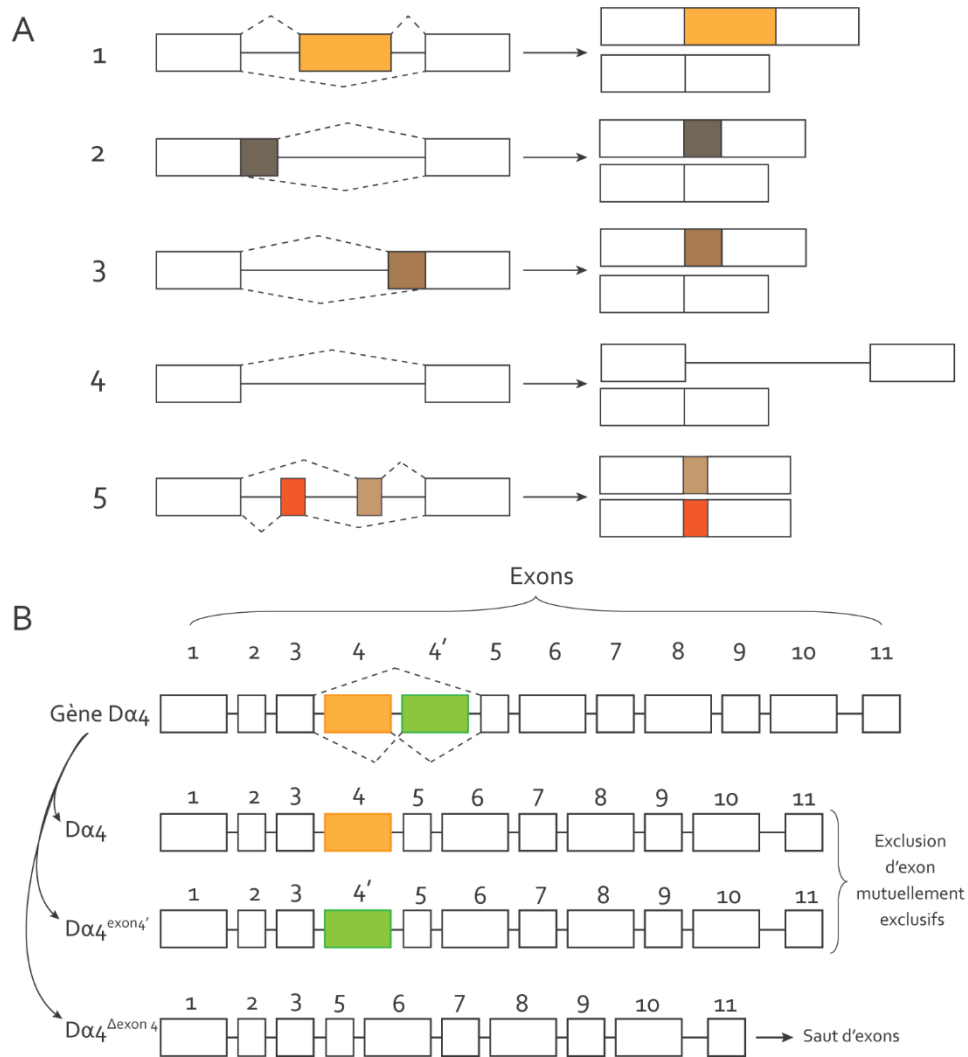


Figure 15 : Illustration des mécanismes d'épissage alternatif, ainsi que l'exemple du gène α_4 .

(A) Les différents mécanismes d'épissage sont représentés : (1) le saut d'exon, (2) et (3) le site d'épissage alternatif en 5' et en 3' respectivement, (4) la rétention d'exon et (5) les exons mutuellement exclusifs. Les exons constitutifs sont sous forme de rectangles incolores et les exons alternatifs par des rectangles de couleurs. Les lignes reliant les exons correspondent aux introns et les lignes en pointillés représentent les options d'épissage.

(B) L'exemple de l'épissage alternatif du gène α_4 est représenté. Ces épissages permettent d'obtenir 3 séquences codantes chez *D. melanogaster*, *A. mellifera* et *B. mori*, (Jones and Sattelle 2010; Lansdell and Millar 2000a; Keren, Lev-Maor, and Ast 2010).

3 - Caractérisation pharmacologique des nAChRs chez les arthropodes

3.1 - Historique de l'étude électrophysiologique des nAChRs d'arthropodes

Dans un premier temps, les études électrophysiologiques ont été mises en place sur des cellules neuronales en culture, afin d'étudier les propriétés des récepteurs natifs. Un des premiers modèles utilisés historiquement chez les insectes est celui de la blatte *Periplaneta americana* (Thany 2009), notamment au niveau de ces neurones DUM (Dorsal Unpaired Median) appartenant au sixième ganglion de sa chaîne nerveuse (Lapied, Le Corrionc, and Hue 1990). Cette technique est également appliquée aux cellules de Kenyon provenant des corps pédonculés isolés de cerveaux de l'abeille *A. mellifera* (Wüstenberg and Grünwald 2004; Goldberg et al. 1999), ou encore à des cellules provenant de lignées cellulaires de drosophile (Lee and O'dowd 1999; Towers and Sattelle 2002; Lavielle-Defaix et al. 2011).

Dans un second temps, le clonage des premières sous-unités de nAChRs d'invertébrés, a permis leur expression en système hétérologue, tel que l'ovocyte de xénope, et l'enregistrement de leur activité par la technique de la double microélectrode en potentiel imposé (ou TEVC). Ainsi l'expression de la sous-unité $Sg\alpha 1$ de *Schistocerca gregaria* en système hétérologue a permis la formation de récepteurs homomériques $Sg\alpha 1$ fonctionnels (Marshall et al. 1990). Par contre, l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ de *D. melanogaster* ($Dmel\alpha 2$) ou des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de *M. persicae*, n'ont pas permis d'obtenir de récepteurs homomériques fonctionnels (Sgard et al. 1998; Sawruk et al. 1990). Il en a été de même lors de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 3$ de la cicadelle *N. lugens*, ou bien pour les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\beta 1$ appartenant au criquet *Locusta migratoria* (Liu et al. 2006; Hermsen et al. 1998). Afin de permettre l'expression de récepteurs fonctionnels, la majorité des travaux d'expression hétérologue de sous-unités d'arthropodes ont nécessité une coexpression

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

avec des sous-unités de vertébrés et/ou des protéines accessoires supplémentaires. Chez *D. melanogaster*, les sous-unités Dmel α 1 et Dmel α 2 sont coexprimées avec une sous-unité β 2 de vertébré (Buckingham, Pym, and Sattelle 2006; Ihara et al. 2003). Cette stratégie de coexpression avec une sous-unité β de vertébré a été par la suite appliquée à d'autres espèces d'arthropodes tels que le puceron *M. persicae*, la cicadelle *N. lugens*, ou encore la tique *Rhipicephalus sanguineus* (Lees et al. 2014; Liu et al. 2006; Huang et al. 1999). L'utilisation de la protéine accessoire RIC-3 (Resistant to Inhibitor of Cholinesterase) provenant du nématode *Caenorhabditis elegans* injectée en coexpression avec les sous-unités Dmel α 5 et Dmel α 7, a permis l'expression de récepteurs homomériques et hétéromériques fonctionnels (Lansdell et al. 2012).

3.2 - Identification de différents sous-types pharmacologiques de nAChRs chez les arthropodes

Comme chez les vertébrés, différents sous-types de récepteurs nicotiniques sont présents dans les neurones d'invertébrés et peuvent être définis en fonction de leurs propriétés pharmacologiques (Thany et al. 2007). En général, les nAChRs sont classés en fonction de leur sensibilité/insensibilité à l' α -Bgt. Chez *D. melanogaster*, les récepteurs homomériques composés des sous-unités Dmel α 5, Dmel α 6 ou Dmel α 7 sont sensibles à l' α -Bgt (Lansdell et al. 2012; Fayyazuddin et al. 2006; Wu et al. 2005). Chez *S. gregaria*, le récepteur homomérique α 1 est également sensible à l' α -Bgt (Marshall et al. 1990). L'étude des récepteurs fonctionnels de *M. persicae* montrent deux profils de sensibilité différents, avec des récepteurs homomériques α 1 sensibles et des récepteurs homomériques α 2 et hétéromériques α 2/ β 2 de poulet insensibles à l' α -Bgt (Sgard et al. 1998). De plus, contrairement à ce qui est observé chez les vertébrés, des récepteurs neuronaux hétéromériques peuvent être sensibles à l' α -Bgt. Ainsi des nAChRs composés des sous-unités Dmel α 1, Dmel α 2, Dmel α 3, Dmel β 1 et Dmel β 2 pourrait également appartenir à des récepteurs sensibles à cet antagoniste (**Figure 16**), (Chamaon et al. 2000; Chamaon et al. 2002).

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

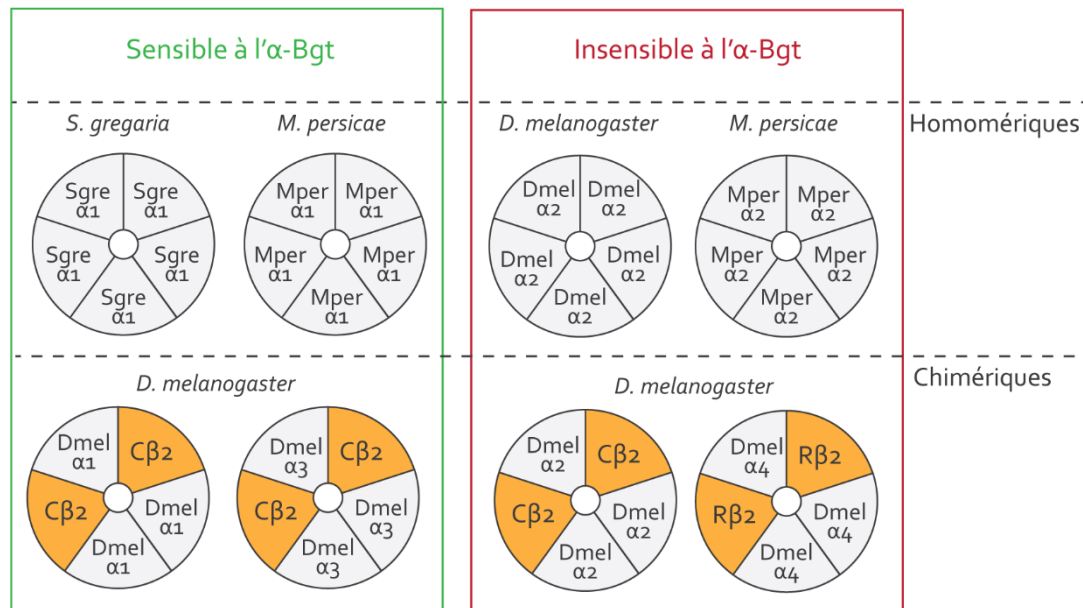


Figure 16 : Représentation des nAChRs sensibles et insensibles à l'α-Bgt.

La sous-unité α1 chez *S. gregaria* et *M. persicae* s'assemblent en récepteurs homomériques sensibles à l'α-Bgt. Contrairement aux sous-unités α2 qui forment des nAChRs insensibles à l'α-Bgt chez *D. melanogaster* et *M. persicae*. Les récepteurs hétéromériques sont qualifiés de chimériques car ils sont constitués de sous-unités α de *D. melanogaster* coexprimées avec une β de vertébré (C pour poulet et R pour rat). La sensibilité à l'α-Bgt varie en fonction de la sous-unité α (modifié d'après (Dupuis et al. 2012)).

Des études complémentaires ont permis d'obtenir un profil pharmacologique plus complet des récepteurs d'arthropodes en observant l'effet de composés agonistes et antagonistes supplémentaires. Par exemple chez la blatte (*P. americana*), deux sous-types de nAChRs ont été décrits suite à des études électrophysiologiques, les nAChRD (« Desensitized nicotinic acetylcholine receptor »), fortement sensibles aux pesticides néonicotinoïdes mais peu sensibles à l'α-Bgt, et les nAChRN (« Non-desensitized nicotinic acetylcholine receptor »), qui montrent une forte affinité pour l'α-Bgt et la méthyllycaconitine (ou MLA), (Salgado 2016; Salgado and Saar 2004). Au niveau des lobes antennaires de l'abeille *A. mellifera*, l'étude électrophysiologique des neurones isolés a montré que la nicotine possède un effet agoniste partiel et que des antagonistes tels que la MLA, l'α-Bgt et la dihydroxy-β-érythroïdine (DHE) ont un effet inhibiteur complet sur la réponse à l'ACh, avec une inhibition irréversible (Barbara et al. 2008). Chez les abeilles adultes de cette même espèce, les nAChRs contenus dans les cellules de Kenyon ont également montré une forte sensibilité à plusieurs

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

antagonistes comme la MLA, l' α -Bgt et la DHE. L'inhibition par ces antagonistes montre une réversibilité, excepté pour l' α -Bgt (Dupuis, Gauthier, and Raymond-Delpech 2011). Des expériences similaires ont été réalisées sur des neurones isolés au stade de pupe. L'application des antagonistes MLA et DHE ont montré qu'ils possèdent une plus forte inhibition sur les neurones provenant des pupes (efficacité augmentée de 2×10^3 et de 5×10^6 pour la MLA et la DHE respectivement). Pour finir, l'utilisation de la nicotine a montré qu'elle n'agit pas de la même façon en fonction du stade de développement. La nicotine agit comme un agoniste complet au stade adulte alors que l'activation des nAChRs n'est que partielle pour le stade de pupe (Dupuis, Gauthier, and Raymond-Delpech 2011; Wustenberg and Grunewald 2004).

3.3 - Etude des sites de liaison des récepteurs d'arthropodes

Les tests de liaison avec des radio-ligands spécifiques des nAChRs et les études de saturation permettent de déterminer l'affinité et le nombre de sites de liaison présents au sein des récepteurs (Maguire, Kuc, and Davenport 2012). Zhang et al., (2004) ont ainsi identifié chez *D. melanogaster* un unique site de liaison à l' α -Bgt en étudiant la fixation du radioligand [^3H]- α -Bgt sur des préparations membranaires de têtes de drosophile (Zhang, Tomizawa, and Casida 2004). De même, l'utilisation d' α -Bgt radiomarqué ([^{125}I]- α -Bgt), a montré la présence d'un seul site de liaison pour l' α -Bgt chez l'abeille *A. mellifera* (Tomizawa M. et al. 1995), *Manduca sexta* (Eastham et al. 1998) et *L. migratoria* (Wiesner and Kayser 2000). Chez deux espèces de pucerons, *M. persicae* et *Acyrtosiphon pisum*, deux sites de liaison, de haute et basse affinité, ont été identifiés (Lind et al. 1999; Taillebois et al. 2014). Des expériences de liaison par affinité ont également été réalisées avec d'autres agonistes spécifiques des nAChRs comme l'imidaclopride ([^3H]-IMI). Chez *M. persicae* et *N. lugens*, deux espèces d'hémiptères, la liaison par affinité a montré la présence de deux sites de liaison pour l'IMI contrairement à *M. sexta* et *M. domestica* (diptère et lépidoptère) qui possèdent un seul site de liaison

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

pour cet insecticide (Lind et al. 1998; Zhang et al. 2000; Li et al. 2010). Chez plusieurs espèces ayant un site principal de liaison identifié pour l'IMI, un second site avec une plus faible affinité a également été déterminé, notamment chez *A. pisum* (Taillebois et al. 2014), *N. lugens* (Li et al. 2010) et *L. migratoria* (Wiesner and Kayser 2000). Également chez *A. mellifera*, suite à une étude toxicologique portant sur l'IMI et ses métabolites, deux types de sites de liaison, à faible et à forte affinité, ont été déterminés (Suchail, Guez, and Belzunces 2001). Une étude de liaison chez la *D. melanogaster* avec l'utilisation d'IMI et d' α -Bgt radiomarqués simultanément a montré la présence de sites de liaison distincts pour ces deux composés, car leur liaison aux récepteurs n'est pas modifiée lorsqu'ils sont utilisés seuls ou en combinaison (Zhang, Tomizawa, and Casida 2004). L'étude de liaison en compétition, qui met en évidence l'affinité des récepteurs pour un ligand radiomarqué quand un ligand froid (non-marqué) sature les sites de liaison du récepteur, a été menée chez plusieurs espèces de pucerons (*M. persicae*, *Aphis craccivora*, *A. pisum*). Ainsi, l'absence de compétition au niveau de la liaison de l'IMI et de l' α -Bgt tritiés a été observée pour ces espèces également (Wiesner and Kayser 2000). Chez la blatte américaine (*P. americana*) plusieurs néonicotinoïdes (acétamipride ou ACE, clothianidine ou CLT, thiaméthoxame ou TMX) ont montré une forte affinité pour les sites de liaison marqués à l' α -Bgt tritié ($[^3\text{H}]\text{-}\alpha\text{-Bgt}$), (Mori et al. 2002). Chez le puceron du pois également, l'IMI peut partiellement inhiber la liaison de l' $[^{125}\text{I}]\text{-}\alpha\text{-Bgt}$ alors que la CLT et le TMX ont montré une inhibition complète (Taillebois et al. 2014). Chez les insectes, les néonicotinoïdes semblent donc se fixer sur des sites de liaisons distincts en fonction des espèces et des molécules considérées (Taillebois et al. 2018).

4 - Mode d'action des néonicotinoïdes

4.1 - Activité neurotoxique des néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes agissent sur les nAChRs et présentent une forte affinité pour les récepteurs d'invertébrés comparé à ceux des vertébrés (Casida and Durkin 2013). Des différences présentes au niveau de la structure et des propriétés des sous-unités de nAChRs entre les vertébrés et les invertébrés peut expliquer en partie la forte sélectivité des néonicotinoïdes pour les arthropodes et la faible toxicité pour les mammifères (Matsuda et al. 2001; Lansdell and Millar 2000b; Nauen, Ebbinghaus, and Tietjen 1999; Tomizawa and Casida 2003).

La première étude montrant qu'un insecticide de type nitrométhylène (2(nitromethylene)tetrahydro-1,3-thiazine ou NMTHT) a été capable d'activer les nAChRs fut réalisée sur les récepteurs homomérique α_1 de *S. gregaria* exprimés en système hétérologue (Leech et al. 1991). Suite à cela, une étude de toxicité sur la mouche *M. domestica* a montré l'activité insecticide de plusieurs néonicotinoïdes (dinotéfurane, IMI et CLT), (Kiryama et al. 2003). D'autres techniques comme les modélisations 3D de récepteurs d'insectes ont été réalisées dans le but d'effectuer *in-silico* l'étude de la liaison de composés aux nAChRs. Par exemple, la modélisation de cinq sous-unités appartenant à *A. mellifera*, basée sur la comparaison avec la structure de l'AChBP de *T. marmorata* a permis d'observer la formation de liaisons hydrogènes avec de l'IMI et du fipronil à de faibles concentrations. D'après les auteurs, ces liaisons montrent qu'à de faibles concentrations de pesticides la survie des abeilles peut être impactée (Rocher and Marchand-Geneste 2008).

Ainsi, les études électrophysiologiques ont permis de montrer la corrélation entre l'ouverture des récepteurs canaux suite à la liaison des néonicotinoïdes et leur effet pesticide (Nishimura et al. 1998; Nishiwaki et al. 2003). Leur effet agoniste mène à une surexcitation des récepteurs présents au niveau synaptique, conduisant à des paralysies et à l'épuisement de l'énergie cellulaire (Tomizawa and Casida 2011). De plus, des expériences avec plusieurs néonicotinoïdes ont permis de montrer que ces

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

molécules peuvent agir de plusieurs manières sur les nAChRs. Des études sur les neurones de *P. americana* ont montré que certains composés sont des agonistes partiels (par exemple l'IMI, l'ACE), (Salgado and Saar 2004; Ihara et al. 2006) et d'autres des agonistes totaux comme la CLT ou le dinotefurane (Tan, Galligan, and Hollingworth 2007; Brown et al. 2006; Kagabu, Matsuda, and Komai 2002). D'autres propriétés des néonicotinoïdes ont pu être observées comme leur capacité à moduler la réponse des nAChRs, par exemple le thiaclopride peut inhiber la réponse à l'ACh sur le récepteur $\alpha_4\beta_2$ de poulet (Toshima et al. 2008). Malgré la forte affinité de ces pesticides aux nAChRs d'arthropodes, une variabilité au niveau de leur action est quand même observée en fonction des espèces ciblées (Honda, Tomizawa, and Casida 2006). De nombreuses études ont été réalisées dans le but de découvrir le mode d'action précis de ces pesticides au niveau des nAChRs d'arthropodes, leur modulation ainsi que leur site de liaison sur les récepteurs.

4.2 - Etude de la sélectivité des nAChRs face aux néonicotinoïdes

La liaison des néonicotinoïdes se réalise sur le même site de liaison que pour l'ACh, ainsi les 6 boucles du domaine N-terminal sont susceptibles de participer à la sélection des néonicotinoïdes (Ihara, Sattelle, and Matsuda 2015). Des études de mutagenèse dirigée ainsi que de patch-clamp ont permis d'identifier sur la sous-unité α_7 de poulet deux résidus pouvant interagir avec le groupe N-nitro présent sur le nitenpyrame ($C=CH-NO_2$) et sur l'IMI, le TMX, la CLT et le dinotefurane ($C=N-NO_2$). Il s'agit d'une glutamine (Q79) localisée dans la boucle D et d'une glycine (G189) présente dans la boucle F (Shimomura et al. 2003; Shimomura et al. 2002; Matsuda et al. 2001). Des mutations réalisées sur la sous-unité α_7 de poulet pour le résidu glutamine (Q79E) diminue fortement la réponse induite par l'IMI. Contrairement à ce résultat, les mutations Q79K et Q79R ont permis d'augmenter significativement la réponse induite par l'IMI et par le nitenpyrame. Ces résultats suggèrent qu'un effet de répulsion se produit entre le groupe carboxylate du résidu glutamate et le groupe N-nitro de l'IMI, réduisant ainsi l'affinité de la molécule aux nAChRs (Shimomura et al. 2002). D'autres mutations

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

effectuées dans la boucle F de la sous-unité $\alpha 7$ de poulet ont pu établir que les mutations induites G189D et G189E réduisent fortement la sensibilité à l'IMI. Ces résultats suggèrent un rôle important de la boucle F dans la formation du site de liaison à l'IMI pour ces récepteurs homomériques $\alpha 7$ (Matsuda et al. 2001). Des études supplémentaires sur le récepteur $\alpha 4\beta 2$ de poulet ont mis en évidence l'importance de la boucle C et de la boucle D dans la formation du site de liaison. Des mutations au niveau de la sous-unité $\beta 2$ (T77R et E79V) rendent le récepteur exprimé plus sensible à l'IMI, qui peut être encore augmenté par la mutation E219P au niveau de la sous-unité $\alpha 4$ (Tomizawa and Casida 2009). Au niveau des sous-unités non- α , des résidus basiques sont présents comme la lysine (K) ou l'arginine (R), et peuvent également interagir fortement avec les groupements N-nitro des néonicotinoïdes par des forces électrostatiques et des liaisons hydrogènes (Shimomura et al. 2006). Une autre étude menée sur la coexpression de la sous-unité $\alpha 3$ de la drosophile avec une sous-unité $\beta 2$ de rat montre une sensibilité plus faible à l'IMI comparé au récepteur formé avec une sous-unité $\beta 4$ de rat. Ainsi la composition en sous-unité α et non- α est importante également dans la sensibilité des sous-types de nAChRs exprimés (Raymond-Delpech et al. 2005).

De plus, des expériences utilisant des sous-unités d'arthropodes ont permis de montrer la sélectivité des néonicotinoïdes face aux récepteurs composés de sous-unités de drosophile. Par exemple, la coexpression de la Dmel $\alpha 2$ avec la $\beta 2$ de poulet et son étude en ovocyte de xénope par des mesures électrophysiologiques a montré une plus forte sensibilité à l'IMI comparé au récepteur $\alpha 4\beta 2$ de poulet. Cette interaction favorisée avec la sous-unité d'insecte peut s'expliquer par la présence de résidus basiques au sein de la boucle D de la sous-unité Dmel $\alpha 2$, et cette caractéristique est retrouvée pour d'autres sous-unités d'insectes (Shimomura et al. 2006). Ce résultat est aussi observé quand la sous-unité $\alpha 4$ de poulet est remplacée par la Dmel $\alpha 1$ (Ihara et al. 2003). De plus, une mutation au niveau de la boucle C de la sous-unité Dmel $\alpha 2$ (P242E) induit une perte de sensibilité à l'IMI, mettant en évidence son implication dans la formation du site de liaison à l'IMI chez la drosophile (Shimomura et al. 2004; Shimomura et al. 2005). Ces informations montrent l'importance des boucle

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

D et C dans les sous-unités α d'insectes pour la formation du site de liaison aux néonicotinoïdes, et que la présence de résidus basiques à des localisations précises augmentent la sensibilité des récepteurs exprimés à ces pesticides.

4.3 - Peu d'études sur l'action des néonicotinoïdes chez les arachnides

De nos jours, peu d'études concernant l'effet des néonicotinoïdes sur les nAChRs d'arachnides ont été réalisées et en particulier chez les tiques. Une étude datant de 2009 réalisée sur la sous-unité β_1 de l'araignée *Pardosa pseudoannulata* ou Ppse β_1 (prédateur connu des ravageurs de culture) a mis en évidence l'implication des boucles D, E et F dans l'insensibilité de cette espèce à l'IMI (Song et al. 2009). L'observation de l'effet des différences de résidus présents dans ces boucles furent évaluées en modifiant les régions ciblées de la sous-unité β_2 de rat par les boucles de la β_1 de *M. persicae* (Mper β_1) ou d'araignée (Song et al. 2009). Les régions correspondantes des sous-unités β ($\beta_2^{\text{Mper}\beta_1}$, β_2 modifiée avec les boucles D, E et F de la sous-unité β_1 de *M. persicae* ou Mper β_1) ont été remplacées par les boucles D, E et F de Ppse β_1 , seules ou ensemble, pour construire différentes chimères. L'étude des récepteurs composés de la sous-unité α_1 de *M. persicae* et des chimères β_2 exprimés en ovocytes de xénope ont montré une augmentation significative de l'EC₅₀ pour l'IMI lorsque le récepteur est composé avec la boucle D de Ppse β_1 comparé au récepteur Mper $\alpha_1\beta_2^{\text{Mper}\beta_1}$ ($9,7 \pm 0,5$ mM et $6,4 \pm 0,5$ mM respectivement). Cette étude a permis de mettre en évidence des résidus présents dans les différentes boucles D, E et F suite à un alignement de séquence de β_1 d'insectes avec la Ppse β_1 . Ainsi les mutations R81Q, N137G et F190W seraient impliquées dans l'insensibilité à l'IMI chez *P. pseudoannulata* (Song et al. 2009). Une autre étude *in-silico* réalisée sur l'alignement des séquences protéiques β_1 de plusieurs espèces de tiques (*Dermacentor reticulatus*, *I. ricinus*, *I. scapularis*, *R. microplus* et *R. sanguineus*) a montré le remplacement de l'arginine présente chez les insectes par une

Introduction : Les récepteur à l'acétylcholine de type nicotinique

glutamine dans la boucle D chez toutes les espèces d'arachnides de l'étude (R81Q), qui serait impliquée dans l'insensibilité des tiques aux néonicotinoïdes (Erdmanis et al. 2012).

Il serait intéressant de compléter ces travaux afin de comprendre, grâce à des expériences au niveau moléculaire sur d'autres sous-unités de tiques et notamment des sous-unités de type α , pourquoi ces organismes sont plus ou moins sensibles aux néonicotinoïdes. Cela pourrait permettre de comprendre le fonctionnement et les interactions des nAChRs de la tique avec les molécules connues et ainsi développer des traitements ciblés et efficaces contre ces organismes parasites.

Contexte du projet de recherche

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse ont été effectués dans le Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), USC INRAE 1328, au sein de l'équipe Entomologie et Biologie Intégrée (EBI). Une des thématiques de recherche de l'équipe EBI est l'étude des mécanismes d'adaptation des arthropodes à leur environnement et particulièrement l'étude des mécanismes de résistance des arthropodes vis-à-vis des composés synthétisés par les plantes, ou les produits phytosanitaires utilisés pour lutter contre leur propagation. L'équipe EBI travaille tout particulièrement sur les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) qui ont connus un fort intérêt ces dernières décennies car 1) ils sont la cible principale des insecticides néonicotinoïdes, 2) ils sont impliqués chez les arthropodes et les mammifères, dont l'Homme, dans les mécanismes de mémorisation et d'apprentissage, et 3) ces récepteurs sont également impliqués dans les maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson et Alzheimer.

C'est dans cette thématique de recherche que s'inscrivent les travaux menés pendant ma thèse, en apportant un nouveau modèle de recherche à l'équipe, la tique *I. ricinus*. Les objectifs étaient de caractériser les nAChRs de la tique *I. ricinus*, au niveau *in-vitro* par la caractérisation pharmacologique et moléculaire, ainsi qu'au niveau *in-vivo* par une étude du comportement d'évitement de la tique. Dans le premier chapitre de la partie Résultats, le profil pharmacologique de récepteurs natifs provenant du synganglion de la tique est présenté. Ce chapitre démontre l'application de la technique de microtransplantation de préparations de membranes dans un système hétérologue. L'étude des nAChRs a été réalisée en utilisant plusieurs composés dans le but de caractériser le profil pharmacologique des récepteurs, notamment des agonistes (ACh et nicotine), des antagonistes (α -BGT, MLA, Mec), un modulateur allostérique positif (PNU-120596) et des pesticides (CLT, IMI, TMX, ACE, DEET et FLU). Le chapitre 2 porte sur l'étude du comportement d'évitement de la tique *I. ricinus* pour deux composés : le DEET (un répulsif utilisé comme standard dans les études sur les arthropodes) et le flupyradifurone (nouvel insecticide appartenant aux buténolides). L'objectif de ce chapitre était d'évaluer et de comparer l'effet du flupyradifurone avec

celui du DEET. Le chapitre 3 porte sur la caractérisation moléculaire des sous-unités de nAChRs provenant du synganglion de la tique *I. ricinus*. Ce travail nous a permis d'identifier plusieurs gènes codant pour des sous-unités de nAChRs chez la tique. Ce travail ouvre des nouvelles perspectives au laboratoire dans l'identification de nouveaux composés plus spécifiques chez la tique et également la compréhension des récepteurs résistants chez la tique *I. ricinus*.

Dans la partie Conclusions et Perspectives, une synthèse des résultats obtenus est réalisée et une prospection des études qui pourraient être menées pour compléter ces résultats est effectuée. Dans les annexes, une publication portant sur la microtransplantation de préparation de membranes du synganglion de la tique *I. ricinus*, ainsi qu'une publication en cours de soumission portant sur l'étude menée sur l'effet du DEET et du FLU, seuls ou en combinaison sur la tique *I. ricinus* sont disponibles.

Matériel et Méthodes

Chapitre 1 : Description du système nerveux de la tique *Ixodes ricinus*

1 - Provenance et conditions de maintien au laboratoire

Les tiques *I. ricinus* ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec les laboratoires BIOEPAR de Nantes (INRAE, ONIRIS, Nantes, France) et CEBC de Chizé (CNRS UMR 7372, Université de La Rochelle, Villiers-en-Bois, France). Des collectes de tiques ont été réalisées plusieurs fois par an afin de récupérer des spécimens femelles adultes pour mener les expériences (**Figure 17**). Deux sites ont été utilisés dans ce but, le premier est Carquefou (44) près du laboratoire BIOEPAR, où les collectes de tiques ont été réalisées à l'affût, à l'aide de draps blancs passés au niveau de la végétation où sont présentes les tiques. Les tiques s'accrochent au tissu et sont ensuite placées dans des tubes. Le second site de collecte est dans la forêt de Chizé. Au niveau de ce site, une collecte directement sur des hôtes a été réalisée grâce au projet de recherche concernant le suivi des populations de chevreuils présents à l'intérieur de la forêt de Chizé. Les chevreuils sont capturés et plusieurs mesures sont effectuées sur les animaux, pendant ce temps, les tiques de l'espèce *I. ricinus* (ici gorgées de sang) sont retirées des animaux à la main ou à l'aide d'un tire-tique, et sont conservées dans des tubes. Entre 100 et 200 tiques peuvent être récoltées par collecte (tout stades de développement confondus).

Les tiques collectées sont conservées à 4°C pour ralentir leur métabolisme et dans le noir. Une humidité constante est également maintenue autour des tubes, car les tiques sont très sensibles à la dessiccation. Les tiques sont ainsi conservées jusqu'à leur utilisation soit pour être utilisées vivantes lors d'expériences d'étude de leur comportement d'évitement, soit pour récupérer le synganglion. Au cours de mes travaux de thèse, environ 740 tiques femelles adultes ont été utilisées pour réaliser les expériences.

2 - Le système nerveux de la tique

Le système nerveux central (SNC) chez la tique est le synganglion, localisé approximativement entre la première et la deuxième paire de pattes, au-dessus du pore génital et en dessous des glandes salivaires (**Figure 18**). Cet organe est décrit comme une masse de fibres nerveuses fusionnées, comprenant les nerfs périphériques qui sont déployés pour contrôler les différents organes de la tique. Il est protégé par une membrane vasculaire appelée gaine périganglionnaire. Le synganglion est approvisionné en hémolymphe fraîche grâce au sinus périganglionnaire qui est présent à l'intérieur de la gaine (Lees and Bowman 2007). Chez les tiques dures adultes les dimensions du synganglion sont comprises entre 300 et 500 μm de long pour 275 à 550 μm de large (**Figure 18**), (Szlendak and Oliver Jr. 1992; Prullage, Pound, and Meola 1992).

L'œsophage de la tique passe à travers le synganglion et le découpe en deux parties (**Figure 19 A**): la partie pré-œsophagienne qui se trouve au-dessus de l'œsophage et qui contient le « protocérébron », une masse dorsale comprenant du neuropile² (principalement composé d'axones et de dendrites) ainsi que des glomérules³. La région pré-œsophagienne permet l'innervation de plusieurs organes à partir des ganglions qu'elle contient, tels que les ganglions chélicéraux, optiques et palpaux. Elle va également servir à l'innervation du pharynx et de l'œsophage de la tique. La seconde partie du synganglion est appelée la région post-œsophagienne, c'est la plus grande des deux régions. Cette partie du synganglion est notamment composée de quatre paires de ganglions podaux qui vont innerver les quatre paires de pattes de la tique. La paire de ganglion podaux en position antérieure a également un rôle au niveau olfactif car elle va être reliée à l'organe de Haller, présent à

² Enchevêtrement de protrusions cytoplasmiques issues des neurones (axones et dendrites) et des cellules gliales (oligodendrocytes et astrocytes). Le neuropile est le siège de nombreux échanges métaboliques.

³ Petit amas de glandes, ou de vaisseaux, zone à très forte densité synaptique

l'extrémité de la première paire de pattes de la tique. Au niveau de la partie postérieure du synganglion, des nerfs permettent d'innover le système génital, les muscles dorso-ventraux, les muscles au niveau postérieur, ainsi que ceux autour des stigmates (N_{Opi} , N_{Gen} , N_{Par} , **Figure 19 B**), (Lees and Bowman 2007; Šimo et al. 2009).

3 - Dissection des tiques et prélèvement de leur synganglion

Les tiques sont conservées à 4°C jusqu'à la dissection afin d'assurer une anesthésie par le froid durant la manipulation. Les instruments de dissection (pinces fines et lame de scalpel) sont désinfectés avant leur utilisation avec de l'éthanol dilué à 70%. La dissection est réalisée sous loupe binoculaire et la tique est maintenue en position ventrale (*scutum* apparent) dans une boîte de pétri à l'aide de scotch double-face. Une incision périphérique est effectuée afin de retirer la partie dorsale de la cuticule, en coupant au niveau du *capitulum* (« tête » de la tique). A cette étape, du PBS 1X (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na_2HPO_4 , 1,8 mM de KH_2PO_4 , pH = 7,4) est ajouté pour recouvrir entièrement la tique et ainsi conserver l'hydratation des tissus. Les organes recouvrant l'emplacement du synganglion (glandes salivaires, sacs ovariens, intestins, trachées) sont soigneusement poussés ou bien retirés à l'aide des pinces et déposés à côté du corps de la tique. Le synganglion est repéré grâce à sa forme (masse plutôt ronde), sa couleur et sa texture (blanc translucide, presque brillant en fonction de la focale de la loupe). Pour les tiques gorgées de sang plusieurs rinçages de l'intérieur du corps de la tique à l'aide de PBS 1X sont nécessaires pour éliminer les contaminants liés à la présence de sang dans l'organisme. Le synganglion est soit retiré à l'aide des pinces fines (s'il est intact et bien visible), soit récupéré avec une partie de la cuticule et rincé au PBS (en cas de doute sur son intégrité). Les synganglia de tiques sont conservés par lot de 10 dans des tubes 1,5 mL congelés dans l'azote liquide et stockés à -80 °C.

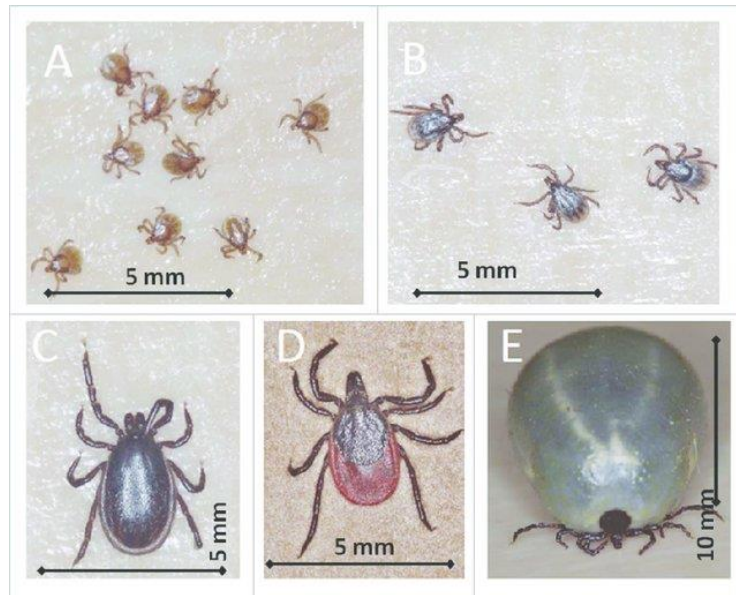


Figure 17 : Représentation des différents stades de développement de la tique *Ixodes ricinus*.

(A) Les larves d'environ 0,8 mm ; (B) les nymphes d'environ 1,5 mm de long ; (C) le mâle adulte qui mesure 2,5 mm de long ; (D) la femelle adulte non gorgée qui mesure environ 4 mm de long et pour finir la femelle adulte gorgée à réplétion d'environ 11 mm de long (Chrdle, Chmelík, and Růžek 2016).

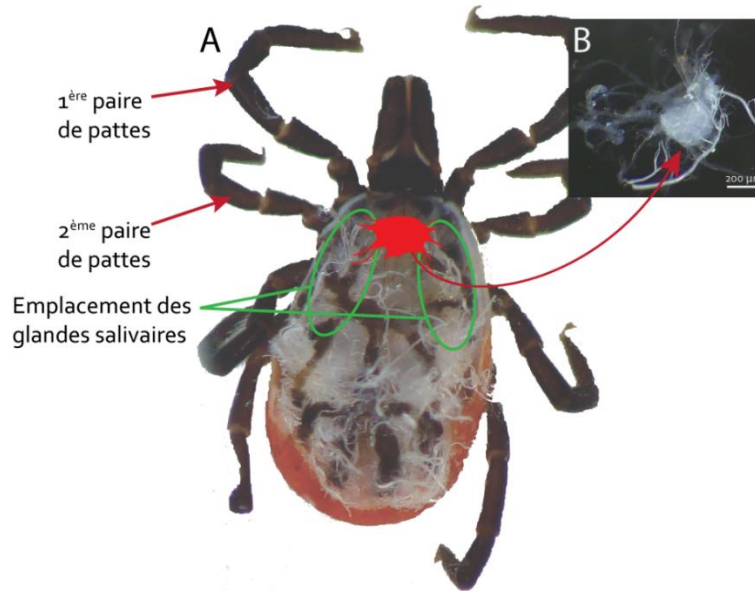


Figure 18 : Illustration de l'anatomie de la tique et de l'emplacement de son synganglion.

(A) Photo d'une tique après dissection pour récupérer son synganglion dont la localisation est représentée en rouge. (B) Photographie d'un synganglion isolé et extrait de la tique. L'échelle est représentée par la barre horizontale et équivaut à 200 µm.

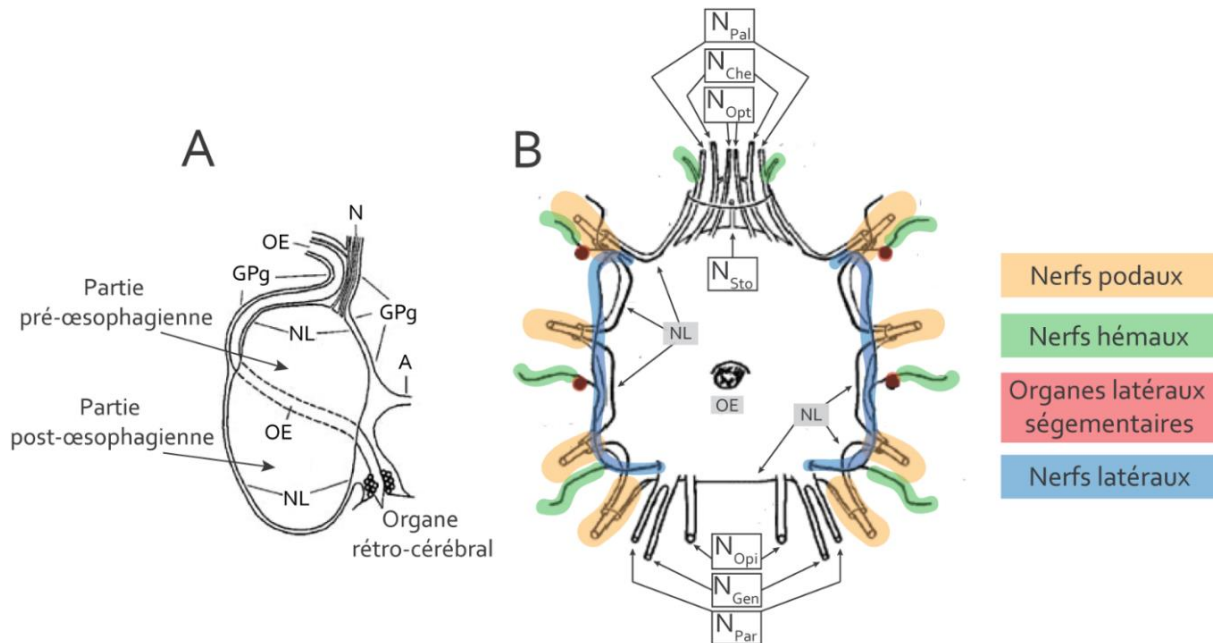


Figure 19 : Représentation schématisée de l'anatomie du synganglion de la tique et des nerfs périphériques et organes qui lui sont associés.

(A) Illustration de la vue latérale du synganglion qui décrit la position des organes associés. Le synganglion est séparé en deux parties décrites comme pré-œsophagienne et post-œsophagienne. Au niveau de l'extrémité de l'œsophage (OE), l'organe retro-cérébral est représenté (N : Nerfs, GPg : Gaine Périganglionnaire, NL : Neurilemma, modifié d'après Simo et al., 2009). (B) Représentation de la vue dorsale du synganglion comprenant les nerfs périphériques et les organes latéraux segmentaires (Npal : Nerfs palpaux, NChe : Nerfs chélicéraux, NOpt : Nerfs Optiques, Nsto : Nerf stomédal, NOpi : Nerfs Optisthosomaux, NGen : Nerfs Génitaux, NPar : Nerfs Para-spiraculiens), (modifié d'après Šimo et al. 2009).

Chapitre 2 : Etude des récepteurs natifs provenant d'extraits membranaires du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

Cette technique se réalise en plusieurs étapes : après avoir récupéré les synganglia, les protéines membranaires sont précipitées, concentrées par centrifugation sur gradient de sucrose, et resuspendues dans une solution de glycine (**Figure 20-1 à 5**). Cette technique d'extraction a été développée sur des modèles mammifères comme l'Homme ou encore le rat, dans le but d'étudier les récepteurs liés à des maladies neurodégénératives (Eusebi et al. 2009; Miledi et al. 2004; Miledi, Palma, and Eusebi 2006). Elle a également été employée pour l'étude de récepteurs présents dans le système nerveux chez d'autres organismes modèle comme la raie (*T. californica*), le puceron du pois (*A. pisum*), ou encore sur une espèce d'axolotl (*Ambystoma mexicanum*) (Marsal, Tigyi, and Miledi 1995; Crespin et al. 2016; Reyes-Ruiz et al. 2013).

1 - Extraction des protéines membranaires du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

1.1 - Dissociation des tissus et précipitation

Le protocole est réalisé à 4°C dans une chambre froide. Le nombre de tiques nécessaires pour réaliser une extraction de membranes est de 150 individus (*i.e.* nombre de synganglia extraits à l'intérieur d'un tube d'ultracentrifugeuse, Ultra-Clear™ centrifuge tube, Beckman Coulter®). Le broyage des synganglia (par groupes de 10 à 20 synganglia) est réalisé à l'aide d'un pilon motorisé (Argos Technologies® Motorized Pestle Mixer) avec un volume total de 150 µL de tampon d'extraction (ou TE, 50 mM de Tris-HCl, 1 mM d'EGTA, 3 mM d'EDTA, pH = 7,4, supplémenté avec des inhibiteurs de protéases), ajouté en plusieurs fois (**Figure 20-2**). En tout, trois séries de broyages d'une durée de

Matériel et méthode : Etude des récepteurs natifs provenant d'extraits membranaires du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

1 min, espacés de 2 min, sont réalisées. Les lysats résultants des broyages sont regroupés dans un tube de 15 mL (SARTSTEDT). Une centrifugation de 10 min à 180 g (4°C) est réalisée sur le tube contenant les lysats, puis le surnageant est placé dans un tube à ultracentrifugation (Beckman Coulter®). Une pause peut être effectuée à cette étape de la manipulation, les tubes sont alors conservés à -20°C jusqu'à l'étape de précipitation. La précipitation des protéines membranaires est réalisée grâce à une ultracentrifugeuse (Optima XL-100K, Beckman Coulter®). Les tubes à ultracentrifugation sont décongelés sur glace pour ne pas dépasser les 4°C et ainsi conserver les protéines présentes dans le surnageant récupéré. Les tubes sont centrifugés 70 min à 154 000 g (4°C, **Figure 20-3**).

1.2 - Gradient de sucrose et resuspension dans du tampon glycine

Cette étape nous permet de concentrer les extraits en membranes d'intérêt. En effet le gradient est réalisé avec deux solutions de 20% et de 50% de sucrose, qui sont sélectionnées en fonction du poids moléculaire des nAChRs (Crespin et al. 2016; Salvaterra and Mahler 1976). Le culot de membranes du synganglion obtenu est resuspendu dans un volume de 2 mL de sucrose 20% (solution préparée avec du TE) ajouté en plusieurs fois. L'homogénéisation du culot est effectuée par pipetage et à l'aide du pilon motorisé. Dans un nouveau tube à ultracentrifugeuse, 6 mL de sucrose 50% (solution préparée dans du TE) sont déposés afin de former une 1^{ère} phase. On ajoute ensuite délicatement 4 mL de sucrose 20% afin de former une 2^{ème} phase (qui se superpose sans se mélanger à la première). Le volume de sucrose 20% comportant les membranes re-suspendues est ensuite ajouté. Les tubes sont équilibrés à l'aide de sucrose 20%, puis une ultracentrifugation à 274000 g pendant 2h45 est réalisée (programme : accélération 43 g en 2 min 40 et décélération 43 g en 2 min 40, à 4°C).

A la fin de la centrifugation, une source de lumière indirecte est utilisée pour visualiser la fraction d'intérêt présente à l'interface entre les phases 50% et 20% de sucrose (**Figure 20-4**). Elle est

Matériel et méthode : Etude des récepteurs natifs provenant d'extraits membranaires du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

récupérée à l'aide d'une pipette pasteur et placée dans un nouveau tube à ultracentrifugation. Le volume est ajusté entre 10 et 12 mL de TE et les tubes sont centrifugés à 274000 g pendant 50 min (4°C). Le culot est resuspendu dans du tampon glycine (5 mM, diluée dans le l'eau mQ puis filtrée), jusqu'à obtenir un volume final de 10 mL (ajouté progressivement), puis le tube est centrifugé à 274000 g pendant 45 min (4°C). Le culot est resuspendu dans du tampon glycine (5 mM) dans un volume de 100 µL (**Figure 20-5**). La solution est placée dans un tube 1,5 mL et est stockée à - 80°C avant son utilisation. Afin d'assurer une récupération optimale, le tube où a été resuspendu une première fois le culot de protéines est rincé avec du tampon glycine et l'extrait obtenu est conservé dans un tube distinct (- 80°C).

1.3 - Quantification des protéines extraites

La technique de Bradford est utilisée dans le but de quantifier les protéines extraites et purifiées provenant des synganglia de la tique. Cette méthode est un dosage colorimétrique effectuée à l'aide du réactif de Bradford qui va modifier la couleur de la solution à quantifier en bleu (bleu de Coomassie) en fonction de la concentration en protéine. La variation de couleur est mesurée par un spectrophotomètre (µQuant, Bio-Tek Instrument) à la longueur d'onde 595 nm. Le test de Bradford est réalisé à l'aide du kit Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en suivant leur protocole pour la préparation de la gamme étalon réalisée à partir d'une solution de BSA (ou sérum albumine bovin) à 2 mg/mL. La solution d'extraits de membranes provenant du synganglion de tiques a donné une concentration protéique de 2,8 mg/mL utilisée pour réaliser les travaux de microtransplantation en ovocytes de xénope.

2 - Marquage des nAChRs contenus dans les membranes à l'aide d'alpha-bungarotoxine conjuguée à l'Alexa-488

Suite à l'extraction et à la purification de membranes provenant du synganglion de la tique *I. ricinus*, un marquage spécifique des nAChRs est réalisé afin de caractériser la présence de récepteurs fonctionnels dans les extraits protéiques. Pour ce faire, un fluorochrome du groupe des Alexa Fluor® a été utilisé (l'Alexa-488), conjugué à un antagoniste spécifique d'un sous-type de récepteur nicotinique, l'alpha-bungarotoxine (ou alpha-Bgt). La sonde fluorescente Alexa-488 – alpha-Bgt (Life Technologies, Courtaboeuf, France) est incubée en présence de membranes de tiques purifiées.

Pour réaliser cette manipulation, 20 µL d'échantillon de protéines extraites sont utilisés et dilués dans 100 µL de PBS + 0,25% de BSA (pour 100 mL de PBS, 250 mg de BSA a été ajouté). Après avoir bien homogénéisé 1 µL de la solution de travail du complexe Alexa-488 – alpha-Bgt (10 µg/mL) est ajouté et mélangé par pipetage. Le tube est protégé à l'aide de papier d'aluminium pour ne pas impacter la fluorescence du fluorochrome, puis incubé à température ambiante (TA) pendant 4h sous agitation douce. Les protéines sont ensuite précipitées par centrifugation à 35 000 g pendant 20 min (4°C). Le culot est homogénéisé avec 500 µL de PBS + 0,25% BSA (ajouté progressivement), puis le tube est centrifugé à 18 000 g pendant 10 min (4°C). Le culot est finalement resuspendu dans un faible volume de PBS + 0,25% de BSA (pas plus de 2 µL). Un tube témoin est préparé en suivant le même protocole mais le fluorochrome n'est pas ajouté, ainsi lors de la visualisation des échantillons le signal non spécifique peut être soustrait.

La fluorescence est observée à l'aide d'un microscope inversé Olympus IX3 (Olympus, France), à 488 nm, en déposant 1µL de solution de membranes purifiées marquées ou non (témoin), entre lame et lamelle. Des captures d'image sont réalisées à différents grossissements, ainsi qu'en lumière blanche et en fluorescence afin d'observer la présence de fluorescence et de voir si elle est homogène

Matériel et méthode : Etude des récepteurs natifs provenant d'extraits membranaires du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

au niveau des fragments de membranes marquées. La préparation témoin est également observée en fluorescence et des captures d'images sont réalisées à la longueur d'onde étudiée (488nm).

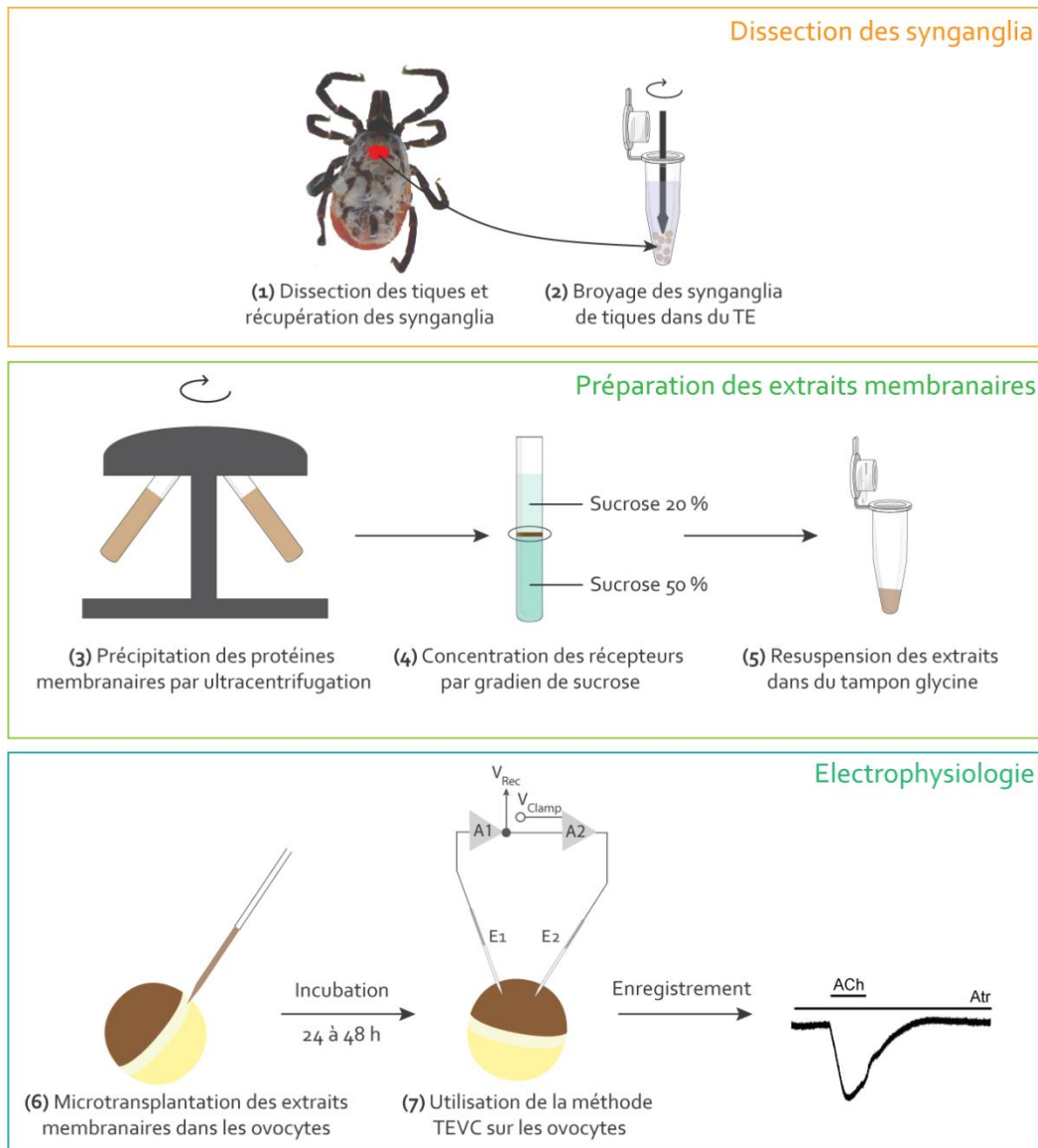


Figure 20 : Illustration des étapes réalisées lors l'utilisation d'extraits membranaires pour effectuer leur microtransplantation en ovocyte de xénope.

(1) Suite à la dissection et (2) au broyage des synganglia de tique, (3) la précipitation des membranes est effectuée par ultracentrifugation en utilisant un rotor à godets oscillant. (4) Ensuite la concentration des récepteurs membranaires est réalisée par ultracentrifugation avec un gradient de sucrose. (5) les extraits membranaires sont resuspendus dans tu tampon glycine (5 mM), puis (6) microtransplantés en ovocytes de xénope pour (7) réaliser leurs enregistrements par la méthode TEVC.

Chapitre 3 : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs de la tique *Ixodes ricinus*

1 - L'ovocyte de xénope, un système d'expression hétérologue

Xenopus laevis est une espèce d'amphibien originaire d'Afrique faisant partie de la famille des *Pipidae*, elle est appelée également Xénope lisse ou Dactylère du Cap (**Figure 21 A**). Cette espèce de xénope est maintenue en élevage en laboratoire, notamment pour l'utilisation des ovocytes de la femelle pour des études d'électrophysiologie (Soreq and Seidman 1992; Stühmer 1998).

Les ovocytes utilisés pour mener les travaux d'électrophysiologie ont été obtenus par la plateforme CRB Xénopes (UMS 3387, Centre de Ressources Biologiques Xénopes, Université de Rennes 1) ainsi que par la plateforme EcoCyte Bioscience (Dortmund, Allemagne). Des fragments ovariens (**Figure 21 B**) nous sont envoyés par les plateformes et contiennent des ovocytes de stade V et VI utilisés pour l'injection de matériel biologiques de tique. Un ovocyte est composé d'un pôle animal pigmenté (couleur brune) et d'un pôle végétatif qui est peu pigmenté (couleur blanchâtre), ainsi qu'une bande équatoriale séparant les deux pôles (**Figure 21 C**). Le noyau de l'ovocyte est très volumineux et se situe au centre du pôle animal.

Les fragments d'ovaires sont maintenus dans une solution standard saline (ou SOS, 100 mM de NaCl, 2 mM de KCl, 1 mM MgCl₂, 1,8 mM de CaCl₂, 5 mM HEPES, à pH = 7,5), séparés en petits fragments d'ovocytes. La préparation des ovocytes avant leur injection est réalisée avec un traitement à la collagénase (2 mg/mL de collagénase IA (Sigma, France) diluée dans du SOS sans Ca²⁺, supplémentée avec 0,8 mg/mL d'inhibiteur de trypsine) afin de les individualiser. Ce traitement enzymatique est réalisé entre 30 min et 1h sous agitation douce, puis un rinçage avec du SOS sans Ca²⁺ est effectué pour retirer l'excédent de collagénase. L'individualisation manuelle des ovocytes est

Matériel et méthode : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs de la tique *Ixodes ricinus*

réalisée à l'aide de pinces fines, sous loupe binoculaire. Les ovocytes défollicularisés sont ensuite injectés et conservés pendant un temps d'incubation défini par le matériel injecté dans une solution de SOS supplémenté avec de la pénicilline (100 U/mL), de la streptomycine (100 mg/mL), de la gentamycine (50 mg/mL) et 2,5 mM de pyruvate de sodium.

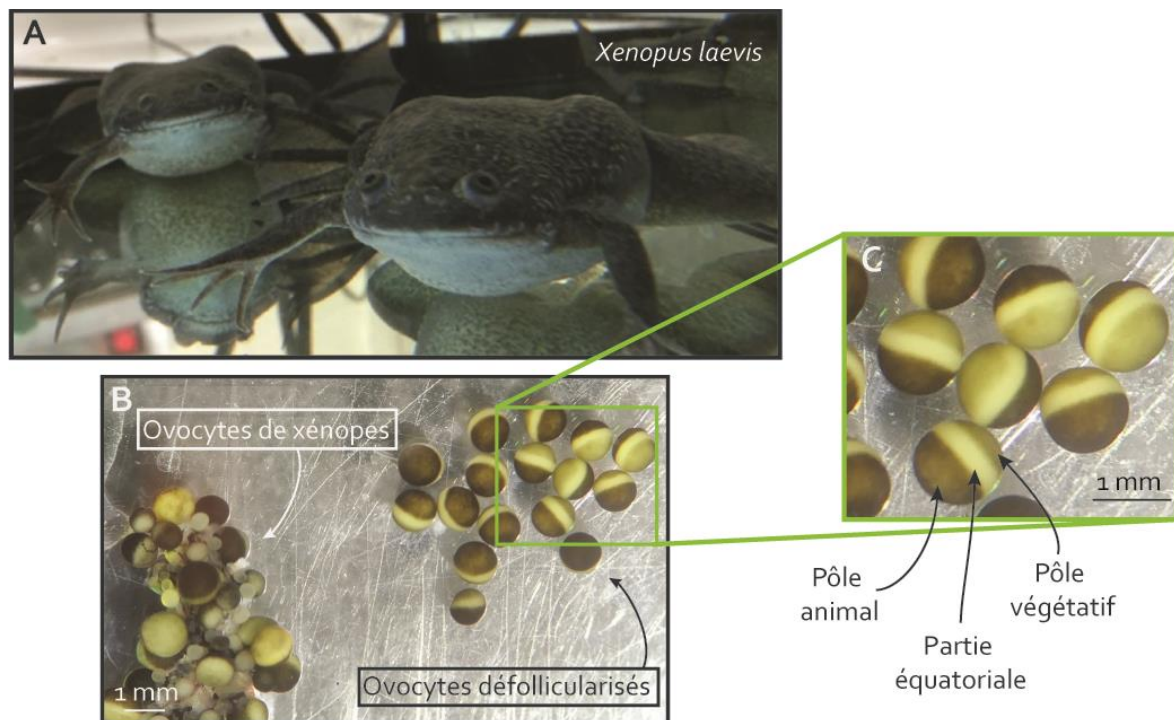


Figure 21 : Illustration du Xénope (A, *Xenopus laevis*) et des ovocytes utilisés pour les expériences d'électrophysiologie de double microélectrode en potentiel imposé (B et C).

2 - Injection des ovocytes de xénope

L'injection de matériel biologique en ovocyte de xénope permet de réaliser l'expression hétérologue de protéines que nous souhaitons étudier en électrophysiologie. Cette injection se réalise dans le cytoplasme pour les préparations de membranes. Un injecteur Nanoliter (Nanoliter 2010, World Precision Instruments) est utilisé afin de réaliser les injections dans les ovocytes de xénope. Des capillaires en verre (Clark Electronical Instruments, Harvard Apparatus) sont étirés à l'aide d'une

Matériel et méthode : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs de la tique *Ixodes ricinus*

étireuse (Sutter Instruments, USA), puis remplis avec de l'huile minérale (Sigma-Aldrich) avant d'aspirer les solutions à injecter à l'aide du Nanoliter (World Precision Instruments).

Dans le cas de l'injection d'extraits membranaires, la solution est aspirée par le capillaire en verre avec une ouverture assez large afin de ne pas créer de bulle d'air, car cette solution possède un aspect visqueux et n'est pas facile à aspirer. Les volumes injectés dans le cytoplasme des ovocytes varient entre 36,8 et 50,6 nL afin d'obtenir une quantité de protéines de 55 ng injectées. Les ovocytes ainsi injectés sont ensuite placés dans du SOS supplémenté en antibiotique et à 18°C pendant 24 à 48h avant de réaliser des enregistrements électrophysiologiques.

3 - Description de la technique de double microélectrode en potentiel imposé

3.1 - Principe de la technique TEVC

La technique de double microélectrode en potentiel imposé (TEVC), mise au point par Barnard et son équipe (Barnard, Miledi, and Sumikawa 1982), permet d'enregistrer l'activité électrophysiologique des récepteurs exprimés au niveau de la membrane des ovocytes de xénope. Deux électrodes sont placées à la surface de l'ovocyte, l'une (E1) va maintenir le potentiel de membrane à la valeur désirée et la seconde (E2) va permettre de mesurer la variation du potentiel au niveau de la membrane de l'ovocyte lorsque les récepteurs sont activés. Ces électrodes sont reliées à des amplificateurs (A1 et A2), permettant de suivre les variations de potentiels au niveau de la membrane. Un système de perfusion permet d'appliquer des molécules au niveau de l'ovocyte et permet également au SOS d'être renouvelé dans le bain grâce à une pompe. De plus, les déchets sont éliminés dans un autre récipient grâce au débit de perfusion appliqué dans la chambre d'enregistrement (**Figure 22**).

Les ovocytes mesurés sont placés individuellement dans une plaque 96 puits à fond conique (SARSTEDT), continuellement perfusée avec du SOS grâce à un système de perfusion et d'aspiration robotisé (Robocyte 2, Multi Channel system, Harvard Bioscience Inc.). Ce système de pompe permet de contrôler le niveau de SOS tout au long de l'enregistrement.

3.2 - Etude électrophysiologique des protéines extraites des synganglia de tiques

L'injection de la solution d'extrait membranaire produit un certain impact sur les ovocytes de xénopes utilisés, notamment dû à l'extrémité large du capillaire d'injection ainsi qu'au volume important et à l'aspect visqueux de la préparation de membrane. Ainsi, un taux de survie entre 30% et 40% est constaté au niveau des ovocytes injectés. De plus, le taux d'enregistrement est d'environ 15% sur les ovocytes testés.

Lors des enregistrements effectués sur les ovocytes de xénopes microtransplantés avec les membranes du synganglion de tique, le potentiel de membrane des ovocytes est maintenu à -60mV (Crespin et al. 2016). Le débit lors de l'étude est maintenu à 2 mL/min et le temps de perfusion est réglé à 20 sec pour l'application des molécules au niveau des ovocytes (Crespin et al. 2016; Miledi et al. 2002). Lors d'expériences incluant des pré-traitements pour observer les effets de modulation des composés sur la réponse à l'agoniste, des bains sont réalisés selon le protocole suivant : perfusion pendant 1min 30sec puis un bain pendant 12min (sans débit) et une dernière perfusion pendant 1min 30sec avant d'appliquer l'agoniste (bain de 15 min au total). Le temps de rinçage des ovocytes est de 5 min lors de ces mesures électrophysiologiques (Ihara et al. 2003).

3.3 - Solutions utilisées pour la caractérisation des nAChRs natifs

Pour l'étude des ovocytes injectés avec des membranes provenant du synganglion de la tique, les agonistes utilisés sont l'ACh ainsi que la nicotine (Nic). Une gamme de dilution est testée dans le but d'obtenir une courbe dose réponse pour les deux agonistes (1 mM, 300 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M) et également le FLU, aux mêmes concentrations que l'ACh et la Nic. Plusieurs autres molécules sont testées : à 1 mM pour l'imidaclopride (IMI), la clothianidine (CLT), l'acétamipride (ACE) et le thiaméthoxame (TMX), ainsi que pour le DEET (N,Ndiethyl-methyl-m-toluamide). Egalement des inhibiteurs des nAChRs comme l' α -Bgt (10 nM), la méthyllycaconitine (MLA, 10 nM), et la mécamylamine (Mec, 1 μ M). Pour finir, le DEET et le FLU ont également été testés à une faible concentration (5 nM) dans le but d'observer leur potentiel effet de modulation sur les réponses aux agonistes de référence (ACh et Nic à 1 mM).

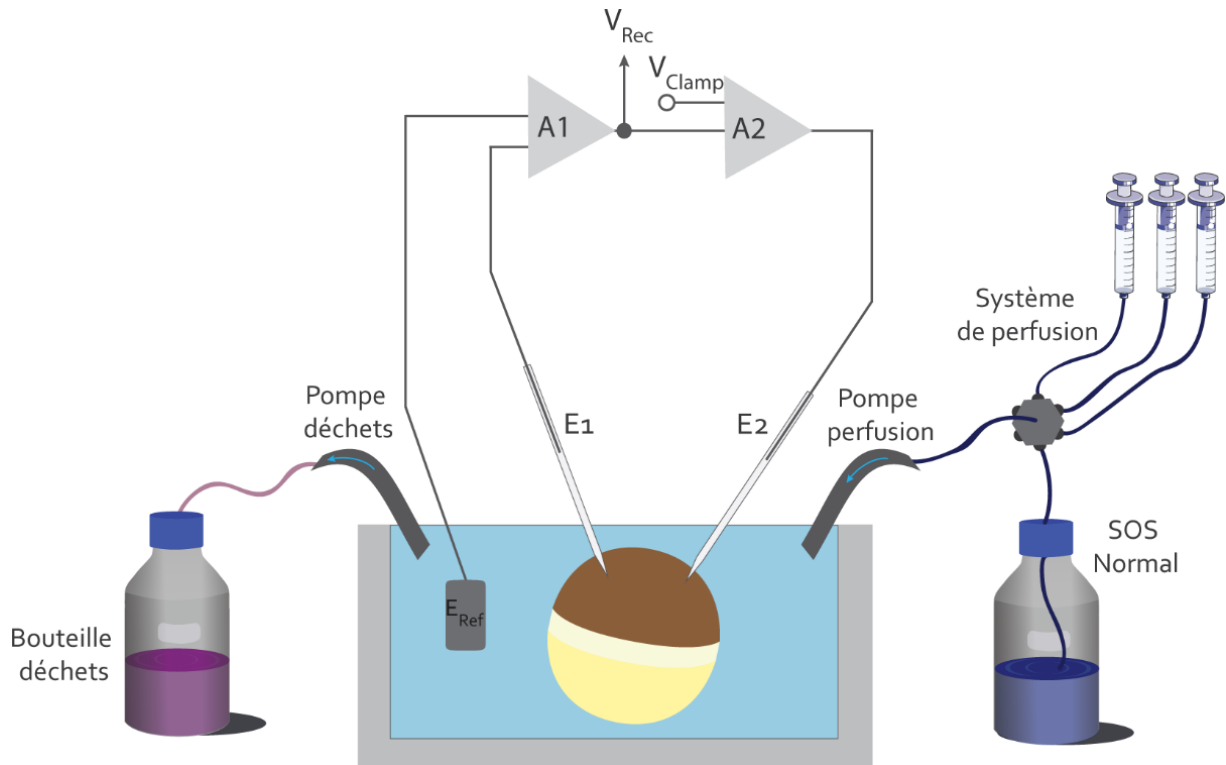


Figure 22 : Représentation de la technique de double microélectrode en potentiel imposé (ou TEVC).

L'ovocyte est placé dans une chambre d'enregistrement remplie de SOS, une électrode de référence est présente dans le même bain. Deux électrodes (E_1 : électrode de voltage, mesurant le potentiel interne de la membrane de l'ovocyte (V_{Rec}) et E_2 : électrode de courant, qui impose le courant (V_{Clamp}) à la membrane de l'ovocyte) sont placées sur la membrane de l'ovocyte et sont reliées à des amplificateurs (A_1 et A_2). Un système de perfusion permet d'appliquer des molécules au niveau de l'ovocyte et au SOS d'être renouvelé dans le bain grâce à une pompe. De plus, les déchets sont éliminés dans un autre récipient grâce au débit de perfusion appliqué dans la chambre d'enregistrement, modifié d'après (Nakagawa and Touhara 2013).

4 - Analyse des données et tests statistiques

Les courants obtenus pour chaque ovocyte mesuré sont enregistrés dans le logiciel Robocyte 2+ (Multi Channel System, WPI). L'amplitude des courants est définie comme l'intensité maximale obtenues au niveau de la réponse aux agonistes appliqués. Un courant contrôle (ACh ou Nic) est réalisé avant les prétraitements pour les différents composés testés (α -bgt, MLA, Mec, DEET et FLU) dans le but de pouvoir comparer avec le courant obtenu suite au pré-traitement. Les données relatives aux courants sont extraites (sous forme de données brutes) et ouvertes dans le logiciel ClampFit (Molecular Devices), dans le but d'extraire le tracé des courants pour illustrer les données électrophysiologiques. Les courants sont normalisés en utilisant la moyenne des amplitudes relatives aux courants contrôles obtenus (I/I_{moyenne}). L'analyse des données est effectuée en utilisant le logiciel Prism 7 (GraphPad) et les données sont présentées en tant que moyenne des réponses \pm SEM (ou erreur type à la moyenne), sous forme d'histogrammes. Les différences entre les courants normalisés contrôles et tests sont analysés en réalisant des tests appariés de Wilcoxon (test unilatéral, échantillons < 30 ovocytes testés) et des Anova unidirectionnelles. Les valeurs d'EC₅₀ pour l'ACh, la Nic et le FLU sont obtenues en utilisant une régression non-linéaire sur les données normalisées par la valeur maximale de réponse à l'ACh 1 mM. Les courbes dose-réponse sont réalisées en suivant l'équation suivante :

$$Y = I_{\text{min}} + \frac{I_{\text{max}} - I_{\text{min}}}{(1 + 10^{(\log(\text{EC}_{50} - X) \times H))}}$$

Où Y est la réponse normalisée, I_{max} et I_{min} sont les réponses maximale et minimale respectivement, H est le coefficient de Hill, EC₅₀ est la concentration qui donne la moitié de la réponse maximale et X qui représente le logarithme de la concentration des molécules.

Chapitre 4 : Etude du comportement d'évitement chez la tique *Ixodes ricinus*

L'étude du comportement d'évitement chez la tique est réalisée en s'inspirant des travaux du Dr. Felix Nchu et son équipe (Nchu, Magano, and Eloff 2012) afin de réaliser le dispositif expérimental. Dans notre étude, le potentiel de répulsion de deux composés est évalué, le DEET (N,N-diethyl-methyl-m-toluamide), un répulsif utilisé au niveau mondial et qui nous sert de contrôle positif, ainsi que le flupyradifurone (ou FLU, 4-[(6-Chloro-3-pyridylmethyl)(2,2-difluoroethyl)amino]furan-2(5H)-one), un nouveau pesticide de la famille des buténolides. Pour cette étude de répulsion, le comportement d'exploration des tiques *I. ricinus* sur une surface plane est observé. Les déplacements des tiques positionnées sur la plateforme sont filmés, et sont ensuite analysés en utilisant le logiciel Toxtrac (Rodriguez et al. 2018). Ce logiciel permet le suivi des mouvements des tiques et ainsi de calculer des paramètres permettant l'analyse du pouvoir répulsif des molécules testées.

1 - Description du dispositif et du protocole expérimental

Cette expérience est réalisée en utilisant une plateforme en polystyrène (20 x 5 cm) qui est fixée à l'intérieur d'un récipient en plastique (L = 36.5 cm, W = 26.5 cm, H = 14 cm, **Figure 23 A**). La plateforme est complètement entourée d'eau, atteignant presque sa surface, pour empêcher les tiques de fuir en dehors de la plateforme. La surface de la plateforme est protégée avec du papier de protection de surface (Sodipro, France) aux dimensions de la plateforme en polystyrène. Un papier filtre (Whatman No. 1, 1 cm x 5 cm) est imprégné avec le solvant (contrôle) ou la molécule testée et est placé au centre de la plateforme à l'aide de scotch double face, créant une « barrière chimique » au niveau de la surface d'exploration des tiques (**Figure 23**). Après 20 min de séchage à l'air libre, un groupe de 5 tiques est déposé sur la plateforme. On définit ainsi une zone de départ (zone 1) où les

Matériel et méthode : Etude du comportement d'évitement chez la tique *Ixodes ricinus*

tiques sont placées au début de l'expérimentation et une zone 2, située de l'autre côté de la barrière chimique (**Figure 23 B**). Une caméra (Canon, PowerShot, SX430IS) positionnée au-dessus du dispositif (**Figure 23 A**) permet d'enregistrer les mouvements des tiques pendant 30 min. Dans un premier temps, une expérience contrôle est réalisée pour observer si le solvant (éthanol absolu ou EtOH, Sigma-Aldrich), a un effet sur le comportement du groupe de tiques testées. Dans un second temps, l'expérience est répétée avec le même groupe de tiques (utilisées lors du contrôle) pour tester l'effet du DEET (à 10% ou 20%, dilué dans l'EtOH 100%) et du FLU (10% ou 20%, dilué dans l'EtOH 100%). Entre 50 et 30 tiques adultes sont utilisées pour réaliser ces expériences pour chaque molécule.

2 - Description du logiciel Toxtrac et analyse des résultats

2.1 - Toxtrac, logiciel d'analyse de vidéo

Toxtrac est un logiciel permettant le suivi des déplacements (ou « *tracking* ») de plusieurs individus en même temps et a permis d'analyser les mouvements des tiques pendant les expériences comportementales (Rodriguez et al. 2018). Ce logiciel utilise un algorithme appelé ToxId permettant d'identifier chaque individu de manière précise et a déjà été appliqué dans l'étude de souris, de poisson zèbre ou encore de fourmis (Rodriguez et al. 2017). Le suivi des individus est possible en jouant sur le contraste des images, permettant ainsi de sélectionner les pixels identifiant les organismes étudiés. Le logiciel ToxTrac génère plusieurs paramètres suite à l'analyse de la vidéo qui sont exploités pour l'étude menée sur les tiques. Les vidéos enregistrées sont de 30 min, au format .MP4 et d'une résolution de 1280 x 720 pixels. L'analyse des vidéos est menée en suivant ces différentes étapes :

1. Suite à l'ouverture du fichier vidéo dans le logiciel, l'aire d'analyse est définie manuellement (dans l'onglet « *Arena Definition* »).

2. Ensuite, les 3 zones sont dessinées sur la l'arène définis (**Figure 23 B**) pour définir la zone où les tiques sont déposées au début de l'expérience (zone 1), la zone représentant le papier filtre au centre de la plateforme (barrière chimique), et la dernière zone où les tiques peuvent se trouver si elles franchissent la barrière chimique (zone 2).
3. Dans l'onglet « *Detection* », la calibration pour détecter les tiques de façon individuelle a été réalisée.
4. Dans l'onglet « *Tracking* », le nombre de tiques à suivre est renseigné, le déplacement maximum par image a été fixé à 25 pixels/image. Le logiciel divise la plateforme analysée (ou arène) en carrés de 50 mm appelées régions (ou « *Areas* », en moyenne il y a 168 régions pour chaque plateforme).

Suite à l'analyse du logiciel, les paramètres calculés sont exportés dans un tableur. Une figure représentant la plateforme avec les différents mouvements réalisés par les tiques (sous forme de tracés de couleur) pendant l'enregistrement vidéo est également généré par le logiciel ToxTrac. Pour réaliser les analyses statistiques, les paramètres suivants ont été sélectionnés : le taux de présence dans la zone 2, le taux d'exploration, la distance totale, la vitesse moyenne, le temps total d'immobilité, et le temps non-visible réalisés par les tiques lors des expériences (**Tableau 7**).

2.2 - Analyses statistiques

Les données brutes obtenues grâce à l'analyse du logiciel Toxtrac ont été ont été normalisées par rapport à la moyenne des valeurs contrôles. Les données sont représentées sous forme d'histogramme présentant la moyenne \pm SEM (ou erreur à la moyenne) pour les groupes contrôles (en présence de solvant) ainsi que pour les groupes tests (en présence de la molécule). Le logiciel Prism 7 (GraphPad) a été utilisé pour analyser les différences entre les groupes contrôles et tests en effectuant des tests unilatéraux de Wilcoxon (échantillon < 30 groupes de tiques).

Tableau 7 : Description des paramètres utilisés pour l'analyse statistique (inspirée par le guide d'utilisation du logiciel ToxTrack, version 2.61).

| Paramètres | Description |
|------------------------------|---|
| Taux de présence (zone 2) | $\frac{(\text{Tiques présentes dans l'image})}{(\text{Tiques dans l'image} + \text{tiques à l'extérieur de l'image})}$ |
| Taux d'exploration | $\frac{(\text{Nombre des régions explorées})}{(\text{Nombre total des régions})}$ |
| Distance totale | <i>Distance totale réalisée par les tiques</i> |
| Vitesse moyenne | <i>Moyenne du paramètre « Instant_Speed »⁴</i> |
| Temps d'immobilité | <i>Durée totale d'immobilité chez les tiques</i> |
| Temps non-visible | $1 - \left(\frac{\text{Nombre d'images où une tique est visible}}{\text{Nombre d'images par seconde dans la vidéo originale}} \right)$ |

⁴ « Instant_Speed » (ou S_i) est défini par la formule suivante (où c = « ana.space ») :

$$S_i^{arena.track} = \frac{\sqrt{(x_{i+c} - x_{i-c})^2 + (y_{i+c} - y_{i-c})^2}}{t_{i+c} - t_{i-c}}$$

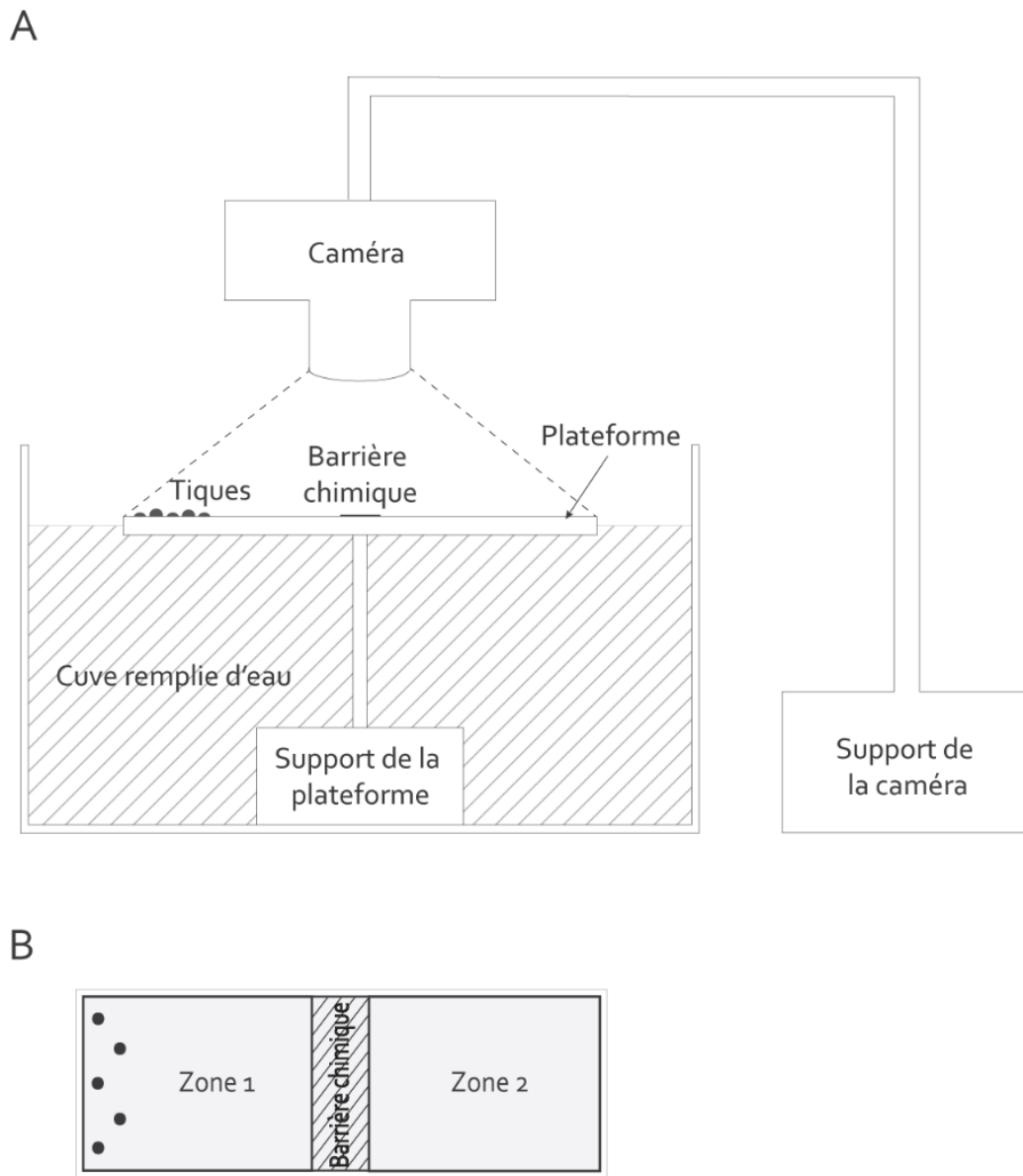


Figure 23 : Description du dispositif expérimental pour l'étude du comportement d'évitement chez la tique *Ixodes ricinus*.

(A) En vue de face, la plateforme (entourée d'eau) est fixée au centre et à la surface du récipient en plastique rempli d'eau. Les demi-cercles gris représentent les tiques déposées au début de l'expérience. La barrière chimique (trait épais sur la plateforme) est placée au centre de la plateforme et la caméra est fixée au-dessus de la plateforme qui permet l'enregistrement des mouvements des tiques. (B) Vue depuis la caméra (au-dessus de la plateforme), les zones définies dans le logiciel sont désignées ici : où les tiques (points gris) ont été positionnées à une extrémité de la plateforme (zone 1), ensuite la barrière chimique au centre et pour finir la dernière zone où les tiques peuvent se rendre si elles traversent la barrière (zone 2).

Chapitre 5 : Caractérisation moléculaire de sous-unités des nAChRs neuronaux exprimés chez la tique *Ixodes ricinus*

La stratégie de caractérisation moléculaire des sous-unités de nAChRs neuronaux chez la tique *I. ricinus* est présentée sur la **Figure 24**. Brièvement, l'extraction des ARNs totaux est réalisée à partir des synganglia conservés à -80 °C et les ARNs messagers (ARNm) sont rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc). Différentes stratégies sont mises en place afin de cloner et séquencer les sous-unités de nAChRs du système nerveux de la tique. Les cadres de lecture ouverts, ou ORF (Open Reading Frame) complets sont ensuite insérés dans un vecteur d'expression pour permettre une amplification spécifique et une potentielle transcription *in-vitro* en ARN. Les différentes étapes sont détaillées dans la suite de ce chapitre.

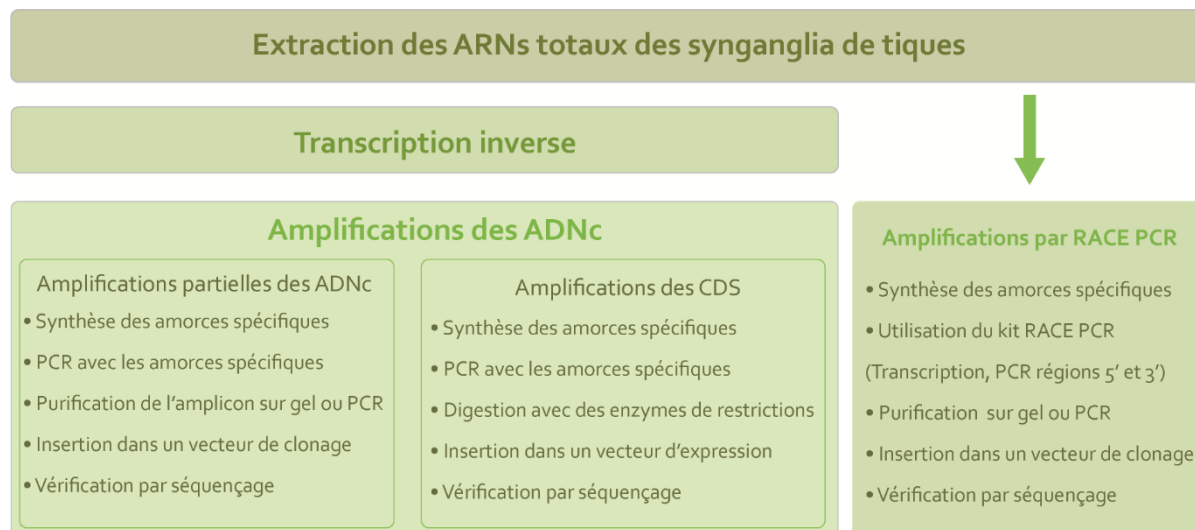


Figure 24 : Schéma reprenant les étapes de caractérisation moléculaire puis de clonage des transcrits de nAChRs de la tique *Ixodes ricinus*.

Le premier encart représente la première étape : l'extraction des ARNs totaux des synganglia de tiques. La deuxième étape (deuxième encart) représente la transcription inverse des ARNs en sélectionnant les ARNm. Le troisième encart à gauche représente les étapes d'amplification par PCR et le dernier encart à droite représente la méthode d'amplification par RACE PCR. Les différentes méthodes d'amplifications sont décrites sous forme de listes d'étapes réalisées.

1 - Préparation des ADNc à partir des transcrits de sous-unités de nAChRs exprimés dans les synganglia

L'extraction des ARNs totaux est réalisée en utilisant le RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne). Ce kit est composé de colonnes de filtration et contient tous les réactifs nécessaires pour la dissociation des tissus ainsi que pour l'extraction des ARN totaux. Ce kit est initialement prévu pour extraire les ARNs totaux provenant de végétaux ou bien de champignons filamenteux, mais il est intéressant à utiliser dans le cas des tiques car la première colonne utilisée permet une filtration pour retenir les morceaux de cuticule pouvant être produits lors du broyage et ne pas impacter la seconde colonne permettant l'extraction des ARNs (**Figure 25 A**). Les tampons RLT et RW1 contiennent du thiocyanate de guanidinium qui permet la dénaturation des protéines mais également l'inactivation des enzymes de types RNAses. Les lots de 10 synganglia de tiques sont sortis et placés dans la glace juste avant la manipulation. Les tissus sont broyés mécaniquement à l'aide d'un pilon motorisé (Argos Technologies® Motorized Pestle Mixer, Elgin, Illinois, USA) avec un ajout progressif de 350 µL de tampon de lyse RLT (1% β-mercaptoéthanol) permettant la dénaturation des protéines. Le lysat est ensuite passé sur la première colonne de filtration avec un tube collecteur et centrifugé 2 min à la vitesse maximale. Pour la suite de l'expérience le protocole du kit est suivi.

Les ARNs sont ensuite précipités pour permettre de concentrer la solution qui les contient (**Figure 25 B**). Au volume d'élution sont ajoutés 10 µL d'acétate de sodium (3 M, pH=5,2, Thermo Scientific), 1 µL de glycogène de moule (Invitrogen™, Carlsbad, Californie, USA) ainsi que de 220 µL d'éthanol (96-100%). Après une incubation sur la nuit (entre 16 à 18h) à -20°C, les tubes sont centrifugés pendant 20 min à 15 000 g à 4°C. Le culot est rincé en ajoutant 400 µL d'éthanol à 70% et une centrifugation est réalisée à 15 000 g (4°C) pendant 10 min. Le culot est finalement séché pendant 20 min à TA pour retirer toutes traces d'éthanol, puis resuspendu dans 7 µL d'eau sans nucléases (incubation dans un bain marie à 55°C pendant 10 min). La concentration et la qualité des échantillons sont évaluées par spectrophotométrie entre 220 et 350 nm à l'aide d'un Nanodrop (Nanodrop One,

Matériel et méthode : Caractérisation moléculaire de sous-unités des nAChRs neuronaux exprimés chez la tique *Ixodes ricinus*

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Le rapport de densité optique 260/280 supérieur à 1,80 donne une indication sur l'absence de contamination en protéines. Le second rapport 260/230 doit être supérieur à 2 pour permettre de déterminer l'absence de sels et/ou de solvant organique (*e.g.*, thiocyanate de guanidinium). Les ARNs ainsi extraits sont conservés à -80°C s'ils ne sont pas utilisés directement pour effectuer la transcription inverse.

La transcription inverse est ensuite effectuée sur les ARNs totaux de la tique *I. ricinus* (**Figure 25 C**) afin d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc). Le protocole du kit *One Taq*® RT-PCR (New England Biolabs® Inc. (NEB), Ipswich, Massachusetts, USA) est suivi sans modification. Les ADNc ainsi obtenus sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2 - Amplification des ORFs de sous-unités des nAChRs neuronaux de la tique *Ixodes ricinus*

2.1 - La technique d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR)

L'amplification des séquences nucléotidiques codant pour les sous-unités des nAChRs est effectuée par la technique de polymérisation en chaîne ou PCR (**Figure 25 D**). Cette technique permet l'obtention de fragments d'ADN spécifique par amplification à partir d'une matrice d'ADN en faible quantité. La technique de PCR se déroule en trois étapes successives : (1) la dénaturation, qui permet le relâchement et la séparation des deux brins d'ADN, (2) l'hybridation des deux amorces (ou oligonucléotides) au niveau de la séquence de la matrice d'ADN ciblée, délimitant la zone à amplifier, et (3) l'élongation pendant laquelle l'enzyme polymérase va synthétiser les brins complémentaires d'ADN à partir des amorces hybridées sur la matrice. Afin de réussir l'amplification des ORFs des sous-unités de nAChRs de la tique *I. ricinus*, deux stratégies ont été mises en place. La première, se basant

Matériel et méthode : Caractérisation moléculaire de sous-unités des nAChRs neuronaux exprimés chez la tique *Ixodes ricinus*

sur des séquences prédites provenant de l'assemblage du transcriptome de cette espèce (données en cours de publication), vise à amplifier les ORFs de sous-unités de nAChRs neuronaux de la tique. La seconde, dans le cas où ces amplifications ne se sont pas concluantes car la séquence prédite diffère de la séquence de la sous-unité native, la technique de la RACE PCR est alors mise en place.

Plusieurs enzymes ADN polymérases sont utilisées afin de réaliser l'amplification des sous-unités de nAChRs de la tique *I. ricinus* : la GoTaq® G2 Flexi (Promega, Madison, Wisconsin, USA), la Taq® (utilisée avec le tampon *ThermoPol*®, NEB) et la Q5® High-Fidelity (NEB). La GoTaq® G2 Flexi (Promega) est l'ADN polymérase utilisée afin d'effectuer les amplifications sur les séquences présentes dans le vecteur de clonage pCR™2.1-TOPO® (Invitrogen™) afin de confirmer les clones à envoyer au séquençage. L'enzyme Q5® (NEB) est utilisée lors des amplifications des fragments comprenant la séquence codante entière pour les sous-unités des nAChRs afin de ne pas avoir de mutations ponctuelles générées par l'activité d'une ADN polymérase qui n'est pas haute-fidélité. Cette enzyme a également été utilisée lors de la technique d'amplification rapide d'extrémités d'ADNc par réaction en chaîne par polymérisation (ou RACE-PCR). L'utilisation de la Taq® (NEB) avec le tampon *Thermopol*® (NEB) permet l'ajout d'une queue poly(A) (polyadénylation) à l'extrémité des fragments d'ADN amplifiés lorsqu'ils sont obtenus avec la Q5® (NEB). Cet ajout de queue poly(A) permet d'effectuer une insertion dans le vecteur de clonage pCR™2.1-TOPO® (Invitrogen™).

2.2 - Amplification des ORFs de sous-unités des nAChRs neuronaux de la tique

Ces amplifications sont réalisées suite à l'élaboration d'amorces basées sur les séquences prédites (**Tableau 8**). L'amplification de la région codante complète est réalisée avec l'enzyme polymérase Q5® (NEB), ainsi les sous-unités *Iricα2*, *Iricα5* et *Iricα6* ont pu être amplifiées complètement par PCR. Le thermocycleur utilisé pour accomplir ces amplifications est le PeqStar (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, USA). Le mélange réactionnel utilisé pour les

Matériel et méthode : Caractérisation moléculaire de sous-unités des nAChRs neuronaux exprimés chez la tique *Ixodes ricinus*

PCR effectuées avec la polymérase Q5® (NEB) est celui présenté dans le protocole de l'enzyme et les programmes PCR réalisés pour amplifier les sous-unités sont présents dans l'**Annexe 1**.

Tableau 8: Amorces utilisées pour réaliser une amplification de la région codante des séquences de sous-unités de nAChRs de la tique *Ixodes ricinus*.

| Sous-unité de nAChR | Nom de l'amorce | Séquence de l'amorce (sens 5' → 3') | Taille du fragment attendu (pb) |
|---------------------|-----------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| $\alpha 2$ | IricA2-CDS-F | CAGGCGTGCCATGGCCTTTC | 1547 |
| | IricA2-CDS-R | GTCCTGGCGAGAGCGTGTTC | |
| $\alpha 6$ | IricA6-CDS-F | ATGAGGAGGACGGCGCGAT | 1551 |
| | IricA6-CDS-R | CTACGCGACCAAGTGCGGTGCC | |
| $\alpha 5$ | IricA5-CDS-F | GTTCCGTGGCGACGTTTGT | 1658 |
| | IricA5-CDS-R | TGCTTGTCTTCGACAGCACG | |

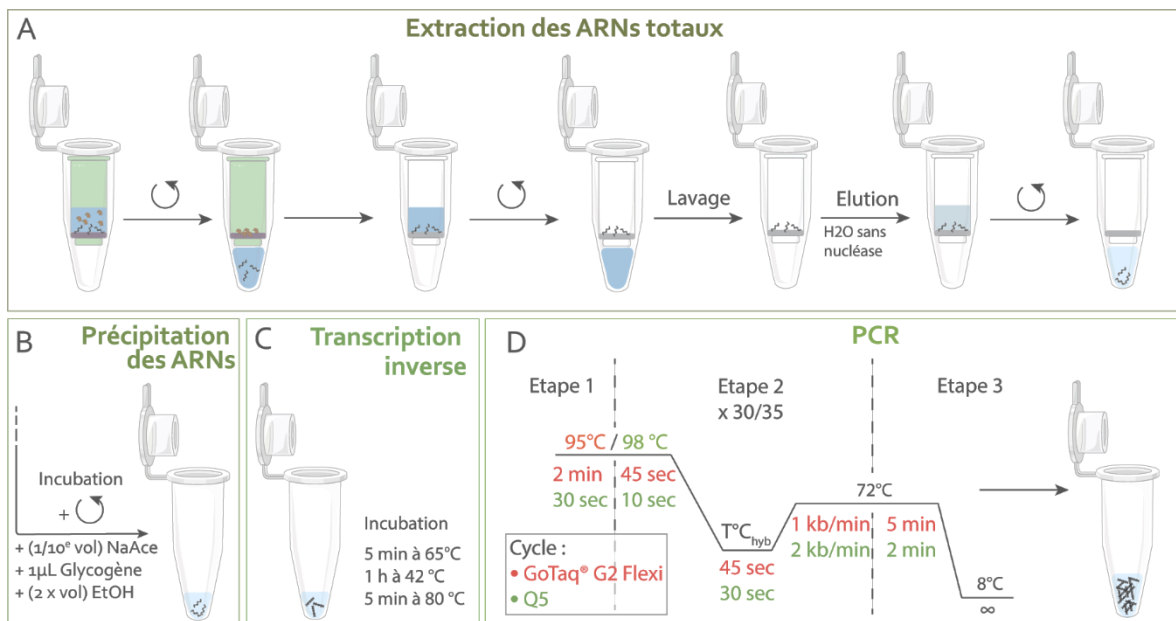


Figure 25 : Illustration des techniques de biologie moléculaire utilisées pour réaliser la caractérisation moléculaire des sous-unités de nAChRs de la tique *Ixodes ricinus*.

Le début de la figure (A) représente les différentes étapes nécessaires pour l'extraction des ARNs totaux des synganglia des tiques. Ensuite (B) la précipitation de ces ARNs totaux extraits est représentée. (C) La transcription inverse pour obtenir les ADN complémentaires ainsi que (D) les amplifications par PCR sont ensuite illustrées.

2.3 - Technique de la RACE PCR

La technique de RACE-PCR est utilisée dans le but d'amplifier les parties codantes et non codantes manquantes de la sous-unité α_1 de la tique *I. ricinus*. Dans un premier temps, la synthèse de la matrice ADNc pour l'amplification de la région 5' est réalisée (**Figure 26-1**). Elle est spécifique à la sous-unité recherchée car une amorce conçue par rapport à la séquence de l' α_1 est utilisée pour la réaliser (IricA1-SP1, **Tableau 9**). Cette synthèse est effectuée avec les réactifs contenus dans le kit et en suivant les indications du protocole. Suite à cette réaction, une purification sur colonne est réalisée en utilisant le kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne).

A partir de la matrice d'ADNc préparée, l'ajout d'une queue poly(A) (polyadénylation ou A-tailing) est réalisé au niveau de l'extrémité 5' du brin synthétisé lors de la transcription inverse (**Figure 26-2**). Cette étape permet l'amplification par PCR avec une amorce fournie par le kit appelé *Oligo-d(T)-Anchor* (**Tableau 9**), qui est conçue pour s'hybrider au niveau de la queue poly(A) ajoutée artificiellement. Deux PCR successives sont ensuite réalisées avec des amorces spécifiques de la séquence α_1 (IricA1-SP2, IricA1-SP3, **Tableau 9**). Une première PCR est effectuée avec l'amorce IricA1-SP2 et l'amorce du kit appelé *Oligo-d(T)-Anchor*, en utilisant l'enzyme polymérase Q5® (**Figure 26-3**). Le programme PCR suivi est décrit dans l'**Annexe 1** et le thermocycleur utilisé pour accomplir cette amplification est le PeqStar (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, Delaware, USA). Suite à cette première amplification, une PCR emboîtée (ou « *Nested PCR* », **Figure 26-4**) est effectuée en reprenant les mêmes conditions d'amplification que pour la PCR précédente (**Annexe 1**), la seule différence est l'utilisation de l'amorce IricA1-SP3, positionnée en interne par rapport à l'amplification avec l'amorce IricA1-SP2 (**Figure 26-4**).

Pour l'amplification de la région 3' de la sous-unité de Iric α_1 , la préparation des ADNc comporte quelques simplifications, comparée à la synthèse de la région 5'. Pour cette synthèse, l'étape de polyadénylation n'est pas nécessaire (car à l'extrémité 3' des ARNm, une queue poly(A) est

Matériel et méthode : Caractérisation moléculaire de sous-unités des nAChRs neuronaux exprimés chez la tique *Ixodes ricinus*

déjà présente, **Figure 27-1**). De plus, la préparation des ADNc est réalisée avec l'amorce fournit dans le kit, qui se fixe sur la queue poly(A) des ARNm (*Oligo-d(T)-Anchor*, **Tableau 9**). Le protocole suivi pour réaliser la transcription inverse correspond à celui présenté dans le protocole du kit. Les ADNc obtenus sont utilisés sans être préalablement purifiés. L'amorce IricA1-SP5 spécifique à la séquence α_1 et l'amorce du kit *Oligo-d(T)-Anchor* sont utilisées pour faire une amplification spécifique de la séquence α_1 de la tique pour le brin 3' (programme PCR présent dans l'**Annexe 1** (**Figure 27-2**)).

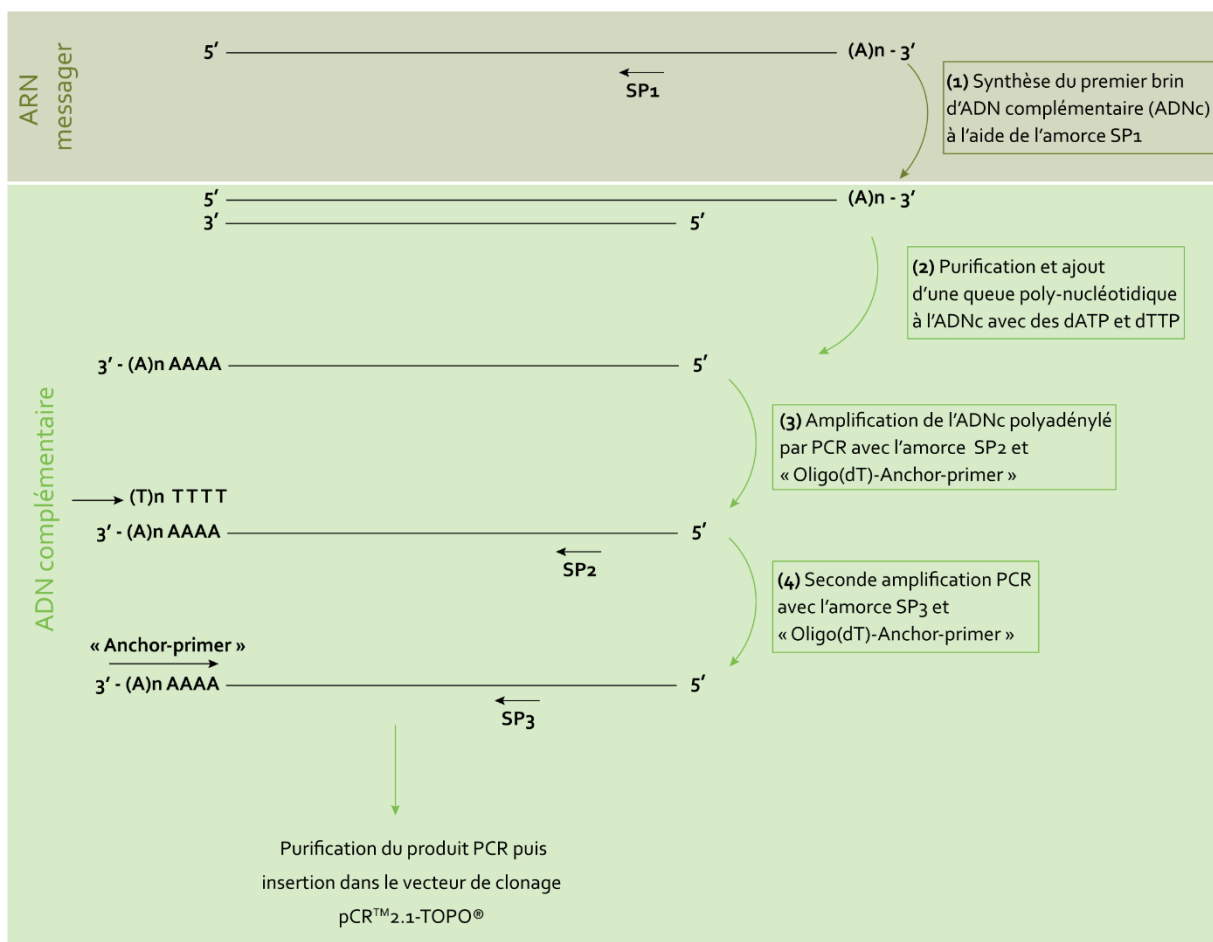


Figure 26 : Représentation schématique de la technique de RACE PCR dans le but d'amplifier la partie 5' du transcrit à caractériser.

Les deux grandes étapes de la RACE PCR pour obtenir le brin 5' sont représentées sur ce schéma. Dans un premier temps, **(1)** la transcription inverse spécifique à la séquence grâce à l'amorce SP1 utilisée. Puis **(2)** l'ajout d'une polyadénylation synthétique au niveau de l'extrémité 5' pour permettre l'amplification de la séquence UTR et codante du transcrit recherché avec l'amorce « Oligo(dT)-Anchor primer » (kit « 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation », Roche, Sigma-Aldrich) et les amorces spécifiques **(3)** SP2 et **(4)** SP3.

Matériel et méthode : Caractérisation moléculaire de sous-unités des nAChRs neuronaux exprimés chez la tique *Ixodes ricinus*

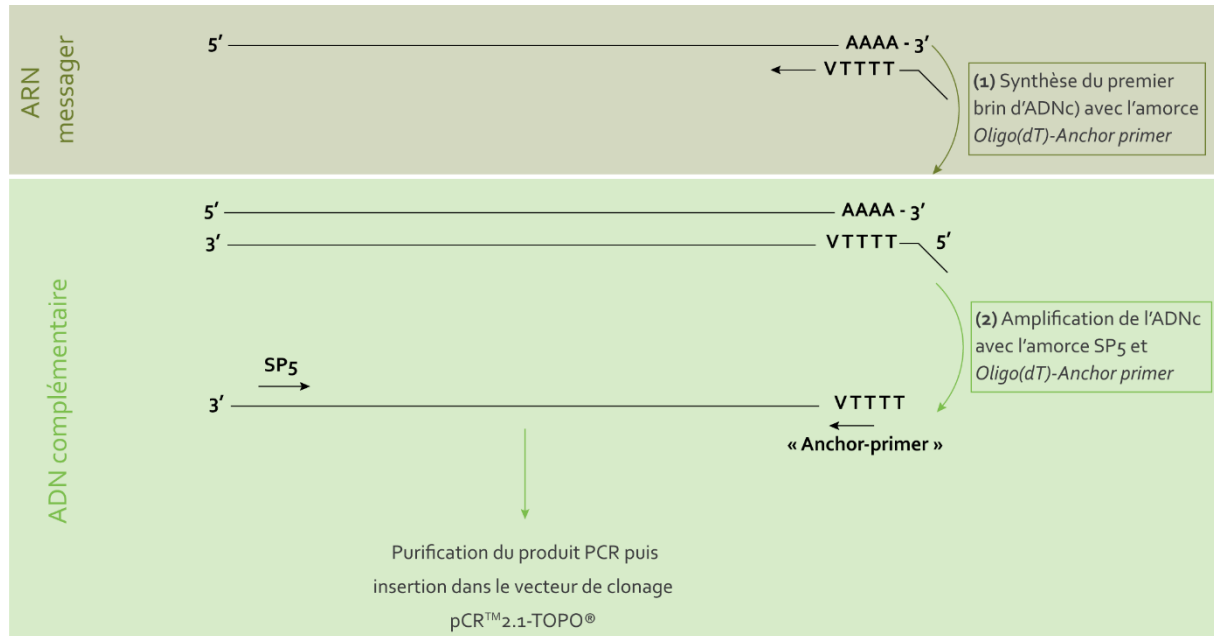


Figure 27 : Représentation schématique de la technique de RACE PCR dans le but d'amplifier la partie 3' du transcrit à caractériser.

Les deux grandes étapes de la RACE PCR pour obtenir le brin 3' sont représentées sur ce schéma. Dans un premier temps, la transcription inverse réalisée avec l'amorce « Oligo(dT)-Anchor primer » (kit « 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation », Roche, Sigma-Aldrich). Puis l'amplification de la séquence UTR et codante du transcrit recherché avec l'amorce « Oligo(dT)-Anchor primer » et l'amorce spécifique SP5.

Tableau 9 : Amorces utilisées pour réaliser une amplification des régions 5' et 3' incluant les régions codantes et non codantes de la séquence α_1 de la tique *Ixodes ricinus*. « Nested PCR » signifie PCR emboîtée.

| Sous-unité de nAChR | Nom de l'amorce | Séquence de l'amorce (sens 5' → 3') | Rôle dans la RACE-PCR | Brin ciblé |
|---------------------|--------------------------|--|----------------------------|------------|
| α_1 | IricA1-SP1 | CGTTGGAGTCGTCGCGTTGGTGCTT | Transcription inverse | 5' |
| | IricA1-SP2 | CCGAGTGAAGGATTGCCTTGGTCA | PCR 1 | 5' |
| | IricA1-SP3 | GGGTCCCAGCGCAATTTGTAATCG | PCR 2 (nested PCR) | 5' |
| | IricA1-SP5 | TAAGATGGCGCCCTGGGTCAAGCAC | PCR | 3' |
| Amorce kit | <i>Oligo-d(T) anchor</i> | GACCACGCGTATCGATGTC-GACTTTTTTTTTTTTTTTTTTV | Se lie à une queue poly(A) | 5' et 3' |

3 - Clonage des sous-unités de nAChRs obtenues par PCR

3.1 - Purification des fragments d'ADN amplifiés

Afin de réaliser les purifications des produits obtenus par PCR, le kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) est utilisé. Les fragments d'ADNc provenant de réactions enzymatiques (comme la PCR) peuvent être purifiés grâce à ce kit de façon directe. Une seconde purification consiste à faire migrer sur gel d'agarose et à découper la/les bande(s) d'intérêt dans le gel après révélation au bromure d'éthidium ou BET (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) pour purifier les fragments d'ADNc à la taille attendue. Pour cela, les produits PCR sont déposés sur du gel d'agarose préparé à 1,5% (PanReac Applichem, ITW Reagents, Darmstadt, Allemagne), c'est-à-dire 1,5 g dilué dans 100 mL de TAE 1X (Tris-Acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH = 8,0). La migration se déroule dans une cuve à électrophorèse (Mini-ES2, ALLSHENG, Hangzhou, Zhejiang, Chine), et un courant de 100 V est appliqué. La révélation des gels se réalise à l'aide de BET (Sigma-Aldrich) avec un bain de 15 min, puis une révélation aux UV. Les bandes d'intérêt sont alors découpées et placées dans un tube 1,5 mL (SARSTEDT), puis le protocole présenté dans le kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) est suivi.

3.2 - Clonage dans le vecteur pCR™2.1-TOPO®

Lors des amplifications par les différentes techniques de PCR décrites précédemment (amplifications des ORFs ou amplifications par RACE PCR), les fragments d'ADNc obtenus sont clonés dans le vecteur de clonage pCR™2.1-TOPO® (Invitrogen™), dans le but d'être séquencés afin de confirmer la séquence d'ADNc obtenue. Le vecteur est fourni sous forme linéaire et comporte également une topoisomérase I qui y est liée de façon covalente. Le plasmide possède une désoxythymine (T) au niveau de son extrémité 3', permettant de réaliser la ligation des fragments

Matériel et méthode : Caractérisation moléculaire de sous-unités des nAChRs neuronaux exprimés chez la tique *Ixodes ricinus*

d'ADN (ou insert) par la méthode de clonage TA (« TA Cloning® »). L'insertion des fragments d'ADNc dans le vecteur pCR™2.1-TOPO® est effectuée par topoisomérisation, lorsque la polymérase utilisée pour la PCR possède une activité terminale transférase permettant l'ajout de désoxyadénosines au niveau des extrémités 3' des inserts amplifiés. Pour les produits PCR provenant de l'amplification avec l'enzyme Q5® (ne possédant pas d'activité terminale transférase), un ajout de désoxyadénosines *in-vitro* est réalisé afin de préparer les inserts à la topoisomérisation. Le protocole donné par le kit de clonage (Invitrogen™) est suivi afin de réaliser l'insertion dans le vecteur pCR™2.1-TOPO®.

3.3 - Insertion dans le vecteur d'expression pGEM

Une autre utilisation de la technique de clonage permet l'insertion des amplifications des ORFs des sous-unités de nAChRs de la tique dans un vecteur d'expression. Afin de réaliser cette ligation, le clonage directionnel est utilisé dans le but de définir le sens d'insertion de l'insert à l'intérieur du vecteur plasmidique, ici le plasmide pGEM est utilisé. Cette méthode de clonage permet d'insérer un fragment d'ADN en utilisant des sites de restrictions compatibles. Le vecteur d'expression pGEM est utilisé dans le but de transcrire *in-vitro* l'ADNc inséré afin de produire des ARNm.

3.3.1 - Information sur le vecteur

Sur la séquence du plasmide pGEM, le promoteur T7 est présent et permet de réaliser la transcription *in-vitro*, il possède également les séquences 5' et 3' de la β -globine du xénope (*Xenopus laevis*) qui encadrent le site où est inséré le fragment d'ADN d'intérêt. Ainsi, des sous-unités de nAChRs peuvent être produites de façon stable dans le but de les injecter dans les ovocytes de xénope.

3.3.2 - Préparation du vecteur pour l'insertion

Pour réaliser l'insertion des ORFs amplifiées, le vecteur pGEM est digéré par plusieurs couples d'endonucléases en fonction des ADNc à insérer dans le vecteur (XmaI/XbaI ou XbaI/BamHI, **Tableau 10**). Ces enzymes sont choisies en fonction des séquences ORFs amplifiées, car les motifs digérés par les endonucléases ne sont pas présents dans les séquences d'ADNc à insérer. La digestion du vecteur est effectuée à 37°C pendant 1h, par les couples d'enzymes XmaI/XbaI (NEB) ou XbaI/BamHI (NEB) en présence du tampon CutSmart® (NEB, 50 mM acétate de potassium, 20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 100 µg/ml BSA, pH 7.9 à 25°C). Au bout de 30 min d'incubation, 1 µL de phosphatase alcaline d'intestin de veau (ou CIAP, Invitrogen™) est ajoutée dans le mélange réactionnel pour déphosphoryler les extrémités 5' du vecteur. Cette étape permet d'éviter que le plasmide ne se recircularise lors de la ligation avec l'insert. Suite à cette première incubation, le mélange est incubé 15 min à 65°C afin d'inactiver les endonucléases. Pour finir, le plasmide digéré et déphosphorylé est purifié à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel).

3.3.3 - Préparation des inserts et clonage directionnel

Des amorces spécifiques des séquences ORFs des sous-unités des nAChRs sont définies suite aux résultats de séquençage des amplifications (**Tableau 10**). Les sites de restrictions reconnus par les endonucléases sont ajoutés aux amorces pour permettre la ligation des transcrits dans le vecteur d'expression pGEM (préalablement digéré avec le couple d'endonucléases correspondantes).

Matériel et méthode : Caractérisation moléculaire de sous-unités des nAChRs neuronaux exprimés chez la tique *Ixodes ricinus*

Tableau 10 : Description des amorces utilisées pour amplifier les ORF des sous-unités de nAChRs de la tique *Ixodes ricinus*

| Sous-unité de nAChR | Nom de l'amorce | Séquence de l'amorce (sens 5' → 3') | Endonucléase utilisée |
|---------------------|-----------------|-------------------------------------|-----------------------|
| $\alpha 1$ | IricA1-ORF-F | gaatataGGATCCTGCCATGGGCGGG | BamHI |
| | IricA1-ORF-R | cttacTCTAGACGGCTTCAGTCGTGG | XbaI |
| $\alpha 2$ | IricA2-ORF-F | taatCCCGGGCAGGCGTGCCATGGCCTTTC | XmaI |
| | IricA2-ORF-R | attaTCTAGAGTCCTGGCGAGAGCGTGTTTCA | XbaI |
| $\alpha 6$ | IricA6-ORF F | taatCCCGGGATGAGGAGGACGGCGCGAT | XmaI |
| | IricA6-ORF-R | attaTCTAGACTACGCGACCAAGTGCGGTGCC | XbaI |

Les amplifications des ORFs des nAChRs sont effectuées en utilisant les séquences clonées et validées par séquençage, présentes dans le vecteur de clonage pCRTM2.1-TOPO[®]. Toutes ces amplifications sont réalisées avec la Q5[®] (NEB) afin de minimiser les erreurs engendrées par l'enzyme polymérase (voir **Annexe 1**). Les produits PCR purifiés sont ensuite digérés en suivant la même procédure que pour la digestion du plasmide pGEM expliquée précédemment (sans ajouter de CIAP aux réactions). Une nouvelle purification des inserts digérés est effectuée avant de faire la ligation dans le vecteur d'expression pGEM. Pour réaliser la ligation, des quantités d'inserts digérés sont mélangés au plasmide digéré en suivant la formule suivante :

$$\text{Quantité d'insert en ng} = 3 \times \frac{(\text{taille de l'insert} \times \text{quantité de l'insert en ng})}{\text{taille du vecteur}}$$

La T₄ DNA ligase (InvitrogenTM) est ajoutée au mélange réactionnel en présence du tampon correspondant à la ligase (250 mM de Tri-HCl (pH = 7,6), 50 mM de MgCl₂, 5 mM d'ATP, 5 mM de DTT et 25% de polyéthylène glycol), qui est ensuite incubé 25 min à 25°C puis 15 min à 65°C pour inactiver l'enzyme. Les ligations sont stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation pour la transformation bactérienne.

3.4 - Transformation bactérienne et criblage des clones obtenus

3.4.1 - Transformation bactérienne

Cette étape du clonage est réalisée à l'aide de cellules compétentes, ici des bactéries modifiées de l'espèce *Escherichia coli* (Cellules chimio-compétentes DG1, Eurogentec, Liège, Belgique), qui sont utilisées pour intégrer le plasmide comportant l'insert que l'on souhaite étudier et en produire en grande quantité lors de la multiplication des cellules. Ces cellules ont subi un traitement chimique qui fragilise leur membrane, ainsi l'entrée du vecteur dans les bactéries peut se réaliser facilement par choc thermique.

Un volume de 5 µL maximum de ligation est ajouté à un tube de DG1 (50 µL) préalablement décongelé dans la glace, puis les bactéries sont incubées 30 min à 4°C. Un choc thermique est ensuite réalisé avec une incubation à 42°C pendant 30 sec sur le tube contenant les bactéries et le produit de ligation, puis le tube est immédiatement replacé dans la glace. Les bactéries sont alors incubées à 37°C pendant 1h à 1h30 sous agitation (250 rpm), dans un nouveau tube supplémenté avec 250 µL de milieu de culture afin de permettre aux bactéries de se multiplier. Les cultures bactériennes sont ensuite étalées sur boîtes de pétri contenant du milieu de culture solide (milieu LB avec agar (*Luria low salt*, Sigma-Aldrich) supplémenté avec de l'ampicilline à 100 mg/mL (Sigma-Aldrich). Les boîtes sont incubées à leur tour à 37°C entre 16h et 18h. Le traitement des boîtes de pétri contenant du milieu solide à l'ampicilline permet uniquement la croissance des bactéries ayant intégrée le plasmide (comportant un gène de résistance à cet antibiotique).

Avant l'étalement de bactéries ayant intégrées le vecteur pCRTM2.1-TOPO®, un traitement à base d'IPTG⁵ (ou isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, 20 mg/mL, dilué dans l'eau, Promega) et de X-gal⁶ (ou 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside, 20 mg/mL, dilué dans du

⁵ L'IPTG est un analogue de l'allolactose qui permet l'activation du gène de la β-galactosidase (*lacZ*).

⁶ Le X-gal permet la production d'un composé bleu lors de son hydrolyse par la β-galactosidase.

Matériel et méthode : Caractérisation moléculaire de sous-unités des nAChRs neuronaux exprimés chez la tique *Ixodes ricinus*

diméthylformamide, Promega) est réalisé (40 μ L de chaque composé par boîte). La séquence plasmidique de pCRTM2.1-TOPO[®] contient le gène lacZ α qui code pour la β -galactosidase et l'insert ne peut s'intégrer qu'entre le gène et le promoteur. Ainsi lorsque l'insert est présent, le gène codant pour la β -galactosidase est inhibé et ne peut pas hydrolyser le X-gal présent sur la boîte. Il est alors possible de discriminer les bactéries ayant intégrées le plasmide contenant l'insert qui seront blanches (β gal⁻), alors que celles n'ayant pas intégrées le plasmide seront de couleur bleues (β gal⁺).

3.4.2 - Criblage et validation des clones

La suite des manipulations consiste à étudier les colonies bactériennes récupérées sur boîtes de pétri afin de cibler celles possédant un insert de taille intéressante (visualisé par migration sur gel après une amplification par PCR), de faire une extraction d'ADN plasmidique pour avoir une grande quantité de vecteur comportant l'insert, puis étudier par séquençage l'insert présent dans le plasmide.

Les colonies bactériennes sont mises en culture dans du milieu LB liquide supplémenté avec de l'ampicilline (100 mg/mL, Sigma-Aldrich). Les colonies sont incubées à 37°C sous agitation (250 rpm) pendant 1h30 à 2h afin de réaliser une préculture. Ensuite un volume de 50 à 70 μ L de culture bactérienne est placé dans un microtube de 0,2 mL (SARSTEDT) afin d'être centrifugé pour culoter les bactéries (centrifugation de 8 min à vitesse maximale). Le culot de bactérie est repris avec de l'eau ultrapure (eau mQ) dans 10 μ L. Cette solution de bactéries resuspendues sert de matrice lors du criblage des colonies par PCR. Les amplifications sont réalisées en utilisant des amorces qui vont s'hybrider sur le plasmide étudié. Pour le vecteur pCRTM2.1-TOPO[®], le couple d'amorce M13F/M13R est utilisé (**Tableau 11**), pour le vecteur pGEM le couple d'amorce pG-1S/Xen-3R est utilisé (**Tableau 11**). Ces couples d'amorces encadrent le site où l'insert s'est intégré dans le vecteur. Cette PCR permet donc de visualiser si l'insert est bien présent et également de vérifier la taille des séquences intégrées et s'il y a des longueurs de fragments différentes.

Matériel et méthode : Caractérisation moléculaire de sous-unités des nAChRs neuronaux exprimés chez la tique *Ixodes ricinus*

Les PCR sur colonies bactériennes sont réalisées avec la polymérase GoTaq® G2 Flexi (Promega) dans un volume de réaction de 25 µL. La matrice ajoutée au mélange est 2 µL de resuspension bactérienne. Les cycles de température utilisés pour chaque couple d'amorce sont répertoriés dans l'**Annexe 1**. Le mélange réactionnel utilisé pour réaliser une PCR sur les colonies bactériennes avec la GoTaq® G2 Flexi (Promega) est décrit dans le **Tableau 12**. Les clones validés par le criblage effectué avec les PCR sont mis en culture dans 2 à 5 mL de milieu liquide LB (supplémenté avec de l'ampicilline à 100 mg/mL) et sont incubés à 37°C sous agitation (250 rpm) pendant 16 à 18h.

Tableau 11 : Description des amorces utilisées lors des criblages des clones par PCR pour les vecteurs pCR™2.1-TOPO® et pGEM.

| Vecteurs | Amorces | Séquence de l'amorce (sens 5' → 3') |
|---------------|---------|-------------------------------------|
| pCR™2.1-TOPO® | M13F | CAGGAAACAGCTATGAC |
| | M13R | GTAAAACGACGGCCAG |
| pGEM | pG-1S | CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG |
| | Xen-3R | GGAGCAGATACGAATGGCTAC |

Tableau 12 : Description du mélange réactionnel pour effectuer des amplifications avec la GoTaq® G2 Flexi (Promega) pour le criblage des colonies bactériennes par PCR.

| Solutions | Volume (µL) |
|------------------------------|-------------|
| Tampon GoTaq® G2 Flexi | 5 µL |
| MgCl ₂ | 1,5 µL |
| dNTP | 0,5 µL |
| Amorce sens (F) (10 µM) | 0,625 µL |
| Amorce anti-sens (R) (10 µM) | 0,625 µL |
| Matrice ADN | 2 µL |
| Enzyme GoTaq® G2 Flexi | 0,125 µL |
| Eau mQ (QSP 25 µL) | 14,625 µL |

3.4.3 - Extraction d'ADN plasmidique

Pour extraire l'ADN plasmidique des bactéries, les cultures sont tout d'abord centrifugées à vitesse maximale pendant 8 min. Pour réaliser l'extraction, le kit GenElute™ Plasmid miniprep (Sigma) est utilisé en suivant le protocole du kit. L'ADN plasmidique est élué avec la solution de Tris-HCl prévue dans le kit (5 mM de Tris-HCl, pH = 8,0) dans un volume de 30 à 60 µL. Les solutions d'ADN plasmidique extraits sont ensuite quantifiées en utilisant le Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc.). La pureté des extractions est vérifiée par l'observation du ratio d'absorbance entre 260 et 280 nm qui doit se situer entre 1,7 et 1,9.

3.4.4 - Validation des clones par séquençage

Les fragments d'ADN clonés dans les vecteurs pCR™2.1-TOPO® et pGEM sont séquencés par la société Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). Le séquençage est réalisé dans les deux sens de lecture de l'insert avec les amorces utilisées lors de la PCR sur colonie (M13F/M13R pour pCR™2.1-TOPO® et pG-1S/Xen-3R pour pGEM). Les résultats sous-forme de chromatogrammes sont analysés avec le logiciel BioEdit (version 7.2.6, (Hall 1999)). L'alignement des séquences ADN et protéiques (suite à une traduction *in-silico*) est effectué avec la technique de ClustalW (Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994). Des recherches de comparaison de séquences (ou BLAST) dans la banque de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information) sont réalisées avec les séquences nucléotidiques et protéiques des sous-unités de nAChRs de la tique *I. ricinus* obtenues, afin de comparer avec les séquences d'autres espèces déjà référencées dans la base de données (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Résultats et discussion

Chapitre 1 : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

1 - Mise en évidence de la présence de différents sous-types de nAChRs dans les synganglia de la tique *Ixodes ricinus*

1.1 - Détermination des conditions expérimentales pour l'obtention de courants nicotiques

La microtransplantation des membranes de la tique *I. ricinus* en ovocytes de xénope a permis l'expression de récepteurs nAChRs fonctionnels. Leur activité a pu être étudiée et des courants induits suite à l'application d'agonistes de références (ACh, Nic à 1 mM chacun) ont été enregistrés, comprenant des réponses d'amplitudes variables. Suite aux réponses observées, les courants enregistrés montrent un profil variable et instable (**Figure 28 A et D**). Ce profil suggère que les réponses à l'ACh et à la Nic sont associées à des réponses complexes incluant l'activation des récepteurs à l'acétylcholine de type muscarinique (ou mAChRs). Ainsi, dans le but d'obtenir des réponses stables induites par l'ACh et la Nic, un inhibiteur des mAChRs, l'atropine (0,5 μ M), a été ajouté au SOS. Dans ces conditions, les courants induits par 1 mM d'ACh sont stables et l'amplitude inchangée par comparaison au contrôle sans atropine (**Figure 28 A et B**). Un effet similaire est constaté lors de l'application de 1 mM de Nic en présence de 0,5 μ M d'atropine (**Figure 28 D et E**). Suite à ces résultats, 0,5 μ M d'atropine a systématiquement été ajouté dans la solution de SOS pour la suite des expériences. Dans ces conditions, nous obtenons des courants entrants avec des amplitudes de -75 ± 10 nA ($n = 16$) pour l'ACh et de -96 ± 13 nA ($n = 23$) pour la Nic. Ces résultats suggèrent la présence de nAChRs dans le synganglion de la tique *I. ricinus*.

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

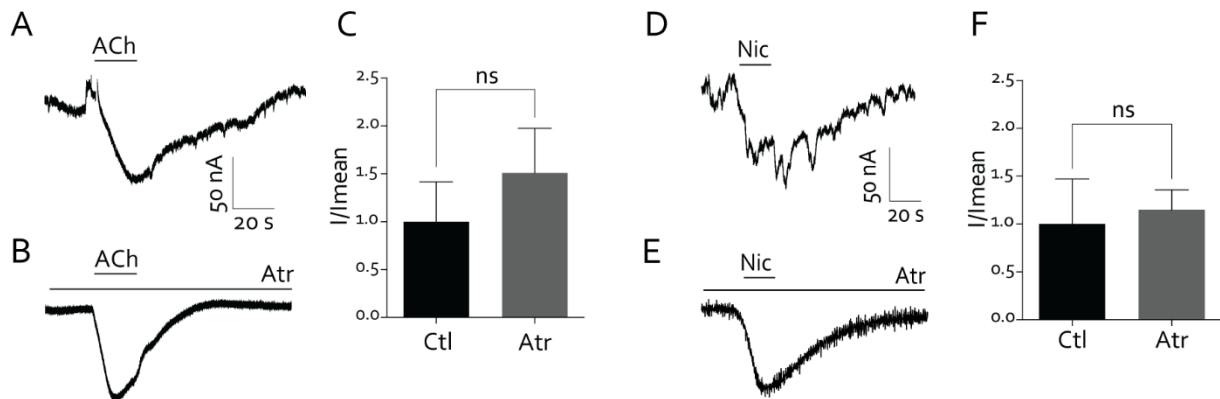


Figure 28 : Etude des courants induits par l'ACh et la Nic dans des ovocytes microtransplantés avec des membranes provenant des synganglia de la tique *Ixodes ricinus*.

Courant induit par l'ACh (1 mM) en absence (A) ou en présence (B) de 0,5 μM d'atropine. (C) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'ACh en absence (Ctl) ou en présence de 0,5 μM d'atropine (n = 16, p > 0,05, ns = non significatif). Courant induit par la Nic (1 mM) en absence (D) ou en présence (E) de 0,5 μM d'atropine. (F) L'histogramme représente le courant moyen induit par la Nic en absence (Ctl) ou en présence de 0,5 μM d'atropine (n = 23, p > 0,05, ns = non significatif). Le trait dessiné au-dessus de chaque courant représente l'application de la molécule et le temps de perfusion est de 20 sec. Les données sont représentées en moyenne ± S.E.M.

Nous avons également enregistré les courants induits suite à l'application de 1 mM de muscarine (Mus). La **Figure 29 A** illustre un exemple de courant induit par 1 mM de Mus, possédant une amplitude de -105 nA et un profil de réponse stable comparé aux réponses obtenues avec l'ACh et la Nic sans atropine (**Figure 29 A**). De plus, l'ajout d'atropine à 0,5 μM bloque complètement les courants induits par la Mus (**Figure 29**).

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

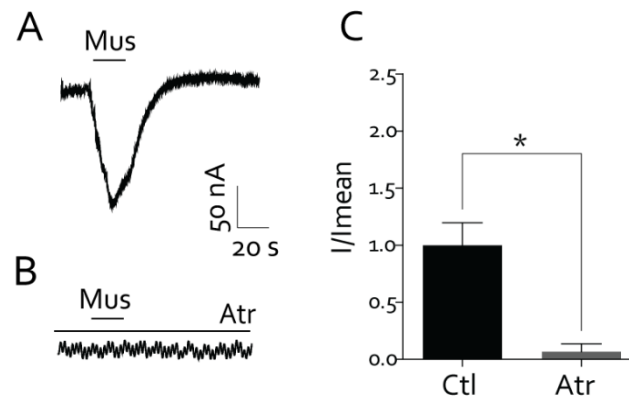


Figure 29 : Etude des réponses induites suite à l'application de muscarine (Mus) sur les ovocytes microtransplantés avec des membranes provenant du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*.

Exemple d'un courant induit par la Mus (1 mM) en absence (A) ou en présence (B) d'atropine (0,5 μM). (C) L'historgramme représente le courant moyen obtenu suite à l'application de Mus en absence (Ctl) et en présence de 0,5 μM d'atropine (n = 8, *p < 0,05, * = différence significative). Le trait dessiné au-dessus de chaque courant représente l'application de la molécule et le temps de perfusion est de 20 sec. Les données sont représentées en moyenne ± S.E.M.

1.2 - Identification de populations de récepteurs nicotiniques sensibles et insensibles à l'α-Bgt

Dans le but de compléter la caractérisation des nAChRs exprimés dans le synganglion de la tique *I. ricinus*, un prétraitement de SOS supplémenté avec 10 nM d'α-Bgt est appliqué pendant 15 min sur les ovocytes microtransplantés. Les courants induits par l'ACh (1 mM) ne sont pas significativement modifiés en présence de 10 nM d'α-Bgt (n = 9, p > 0.05, **Figure 30 A, B et C**). Au contraire, les courants induits par la Nic (1 mM) montrent une inhibition partielle de 27 % lorsqu'un prétraitement de 10 nM d'α-Bgt est réalisé avant l'application de la Nic (n=10, *p < 0.05, **Figure 30 A, B et C**). Ces résultats indiquent la présence de différents sous-types pharmacologiques de nAChRs dont des récepteurs sensibles à l'α-Bgt chez *I. ricinus*.

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

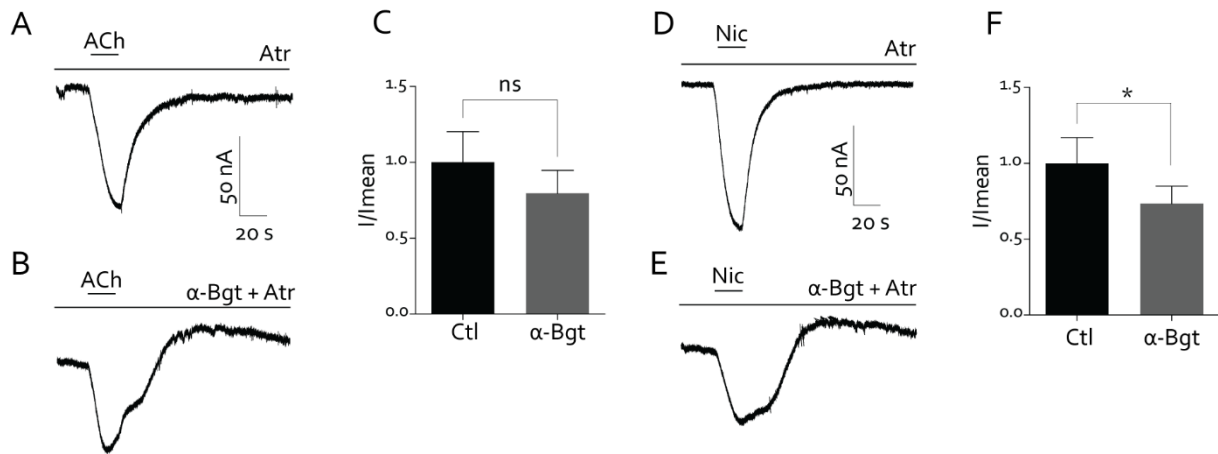


Figure 30 : Etude des courants induits par l'ACh et la Nic en présence ou non d'α-Bgt dans des ovocytes microtransplantés avec des membranes provenant des synganglia de la tique *Ixodes ricinus*. Courant induit par l'ACh (1 mM) en absence (A) ou en présence (B) de 10 nM d'α-Bgt. (C) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'ACh en absence (Ctl) ou en présence de 10 nM d'α-Bgt (n = 9, p > 0,05, ns = non significatif). Courant induit par la Nic (1 mM) en absence (D) ou en présence (E) de 10 nM d'α-Bgt. (F) L'histogramme représente le courant moyen induit par la Nic en absence (Ctl) ou en présence de 10 nM d'α-Bgt (n = 10 et *p < 0,05, * = différence significatif). Le trait dessiné au-dessus de chaque courant représente l'application de la molécule et le temps de perfusion est de 20 sec. Les données sont représentées en moyenne ± S.E.M.

Afin de confirmer la présence des récepteurs, les membranes de synganglia de tique ont été marquées avec de l'Alexa-488 conjuguée à de l'α-Bgt (Alexa-488 – α-Bgt). Comme il peut être constaté sur la **Figure 31 A et B**, des spots de fluorescence sont observables au sein de la préparation de membrane de synganglia alors qu'aucune fluorescence n'est présente dans les préparations de membranes contrôles (non-marquées à l'Alexa-488 – α-Bgt, **Figure 31 C et D**). Ces résultats confirment qu'il existe des récepteurs nAChRs sensibles à l'α-Bgt exprimés au niveau de la membrane plasmique d'ovocytes de xénope microtransplantés avec des membranes du synganglion.

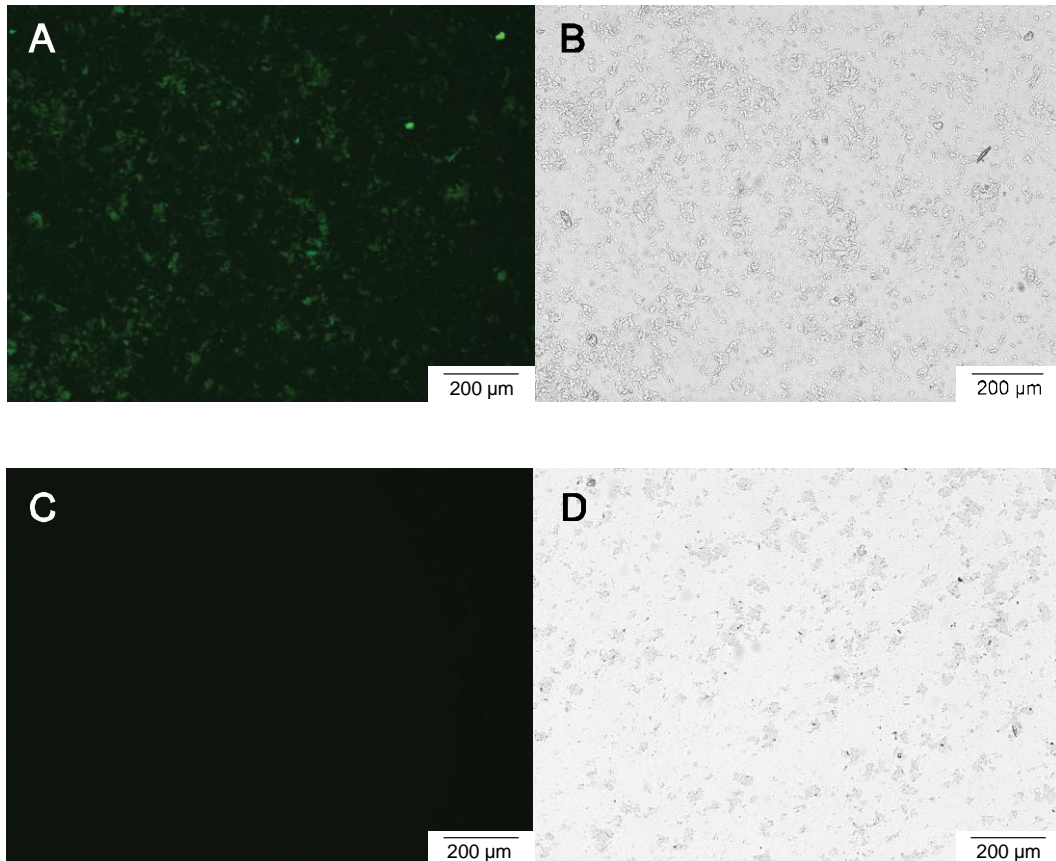


Figure 31 : Marquage des nAChRs sensibles à l'α-bungarotoxine (α-Bgt) dans les extraits membranaires de synganglion de la tique *Ixodes ricinus*.

(A) Membrane du synganglion traitées à l'Alexa-488 – α-bgt, visualisé en fluorescence à 488 nm. (B) Même préparation que pour le A, visualisé en lumière transmise. (C) Préparation de membranes du synganglion contrôle (sans traitement à l'Alexa-488 – α-bgt) visualisé en fluorescence à 488 nm. (D) Même préparation que pour le C, visualisé en lumière transmise.

1.3 - Effet d'un modulateur allostérique, le PNU-120596, sur l'activité des nAChRs du synganglion

Nous avons souhaité trouver des conditions optimales pour l'enregistrement et la caractérisation des courants induits par les récepteurs nicotiques chez la tique *I. ricinus*. Ainsi, le PNU-120596 a été testé sur les ovocytes microtransplantés avec des membranes de synganglia de tique. En absence d'atropine, la pré-application de 1 μM de PNU-120596 uniquement n'entraîne pas de modification significative des courants induits par l'ACh ($n = 8, p > 0,05$, **Figure 32 A, B et C**) ou la Nic ($n = 9, p > 0,05$, **Figure 32 D, E et F**). En accord avec les résultats précédents, on observe une

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

instabilité des courants enregistrés. Ces expériences ont donc été réitérées avec l'ajout d'atropine (0,5 μ M) afin de bloquer les courants muscariniques. Dans ces conditions, l'application du PNU-120596 entraîne une augmentation importante des courants induits par l'ACh 1 mM (Figure 33 A et B) dont l'amplitude passe de -96 ± 5 nA à -175 ± 20 nA ($n = 7$, $*p < 0,05$, Figure 33 C). De façon similaire, l'amplitude des réponses des nAChRs à la Nic est augmentée de $-105 \pm 0,5$ nA à $-201 \pm 4,5$ nA ($n = 23$, $*p < 0,05$, Figure 33 D à F).

Grâce à l'ensemble des résultats obtenus, plusieurs paramètres ont pu être définis pour étudier la sensibilité des récepteurs nicotiniques natifs de la tique *I. ricinus*. Dans un premier temps, nous pouvons conclure que l'utilisation d'atropine est nécessaire à l'étude des nAChRs natifs de la tique car elle permet d'inhiber l'activité simultanée des récepteurs muscariniques. Additionné à cela, l'application de PNU-120596, modulateur allostérique positif, permet d'améliorer le protocole utilisé en amplifiant les réponses des récepteurs natifs de la tique.

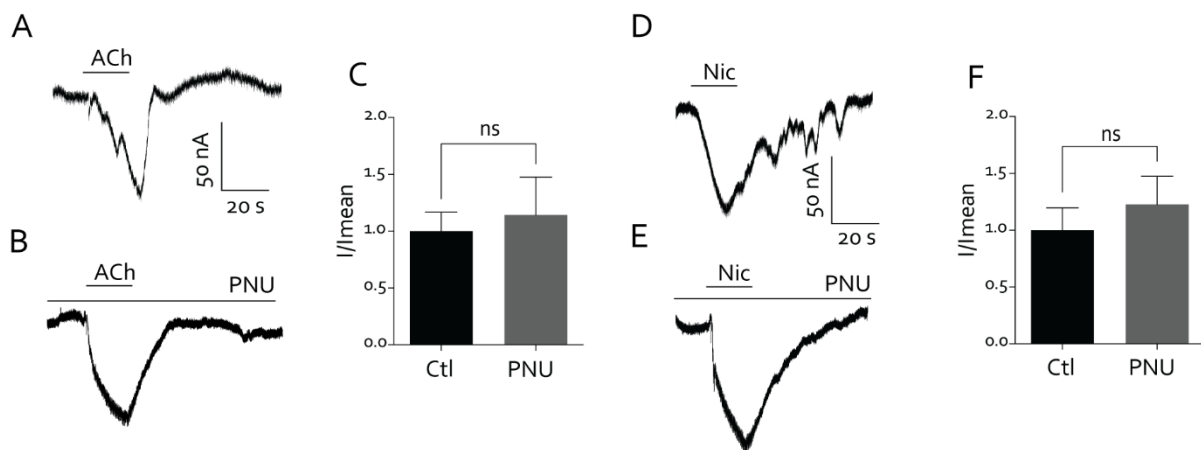


Figure 32 : Effet de modulation du PNU-120596 (PNU) sur les courants induits par l'ACh et la Nic sur des ovocytes microtransplantés avec des membranes de synganglion (en absence d'atropine).

Courant induit par l'ACh (1 mM) en absence (A) ou en présence (B) de 1 μ M de PNU (sans atropine (Atr) 0,5 μ M). (C) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'ACh en absence (Ctl) ou en présence de 1 μ M de PNU ($n = 8$, $p > 0,05$, ns = non significatif). Courant induit par la Nic (1 mM) en absence (D) ou en présence (E) de 1 μ M de PNU (sans Atr 0,5 μ M). (F) L'histogramme représente le courant moyen induit par la Nic en absence (Ctl) ou en présence de 1 μ M de PNU ($n = 9$, $p > 0,05$, ns = non significatif). Le trait dessiné au-dessus de chaque courant représente l'application de la molécule et le temps de perfusion est de 20 sec. Les données sont représentées en moyenne \pm S.E.M.

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

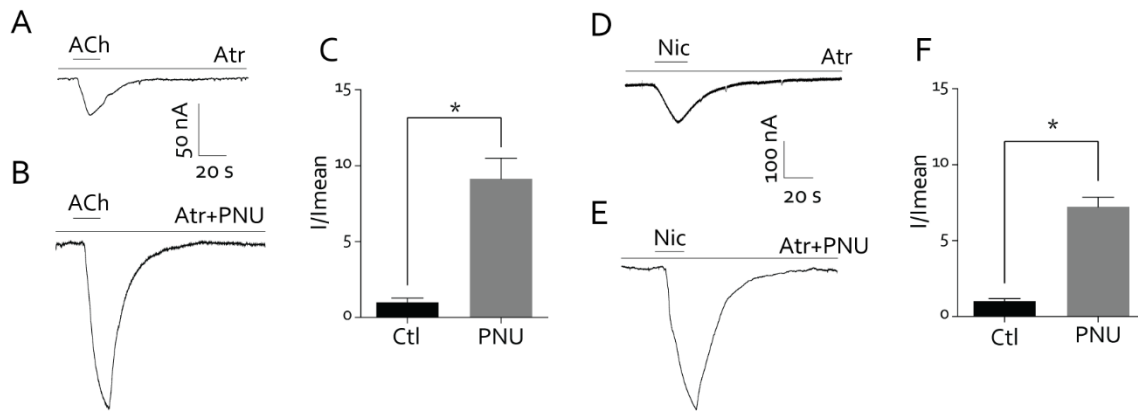


Figure 33 : Effet de modulation du PNU-120596 (PNU) sur les courants induits par l'ACh dans les ovocytes microtransplantés avec des membranes de synganglion (en présence d'atropine).

Courant induit par l'ACh (1 mM) en absence (A) ou en présence (B) de PNU (avec atropine (Atr) 0,5 μM). (C) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'ACh en absence (Ctl) ou en présence de 1 μM de PNU (n = 6, *p < 0,05, * = différence significative). Courant induit par la Nic (1 mM) en absence (D) ou en présence (E) de PNU-120596 (avec Atr 0,5 μM). (F) L'histogramme représente le courant moyen induit par la Nic en absence (Ctl) ou en présence de 1 μM de PNU (n = 6, *p < 0,05, * = différence significative). Le trait dessiné au-dessus de chaque courant représente l'application de la molécule et le temps de perfusion est de 20 sec. Les données sont représentées en tant que moyenne ± S.E.M.

2 - Caractérisation pharmacologique des sous-types de nAChRs natifs de la tique

2.1 - Utilisation d'α-Bgt, de mécamylamine et de méthyllycaconitine

Suite à ces résultats et pour compléter la caractérisation des nAChRs exprimés dans les ovocytes microtransplantés avec les membranes du synganglion, un bain contenant 10 nM d'α-Bgt en présence de 0,5 μM d'atropine et de 1 μM de PNU-120596 a été réalisé avant l'application d'agoniste (ACh et Nic à 1 mM). Le traitement à l'α-Bgt a induit une diminution significative des courants à l'ACh (**Figure 34 C**) et à la Nic (**Figure 34 F**). Des diminutions de 33 % (n = 6, *p < 0,05) et de 45 % (n = 10, *p

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

< 0,05) ont été observées pour les courants induits après application d'ACh et de Nic respectivement (Figure 34).

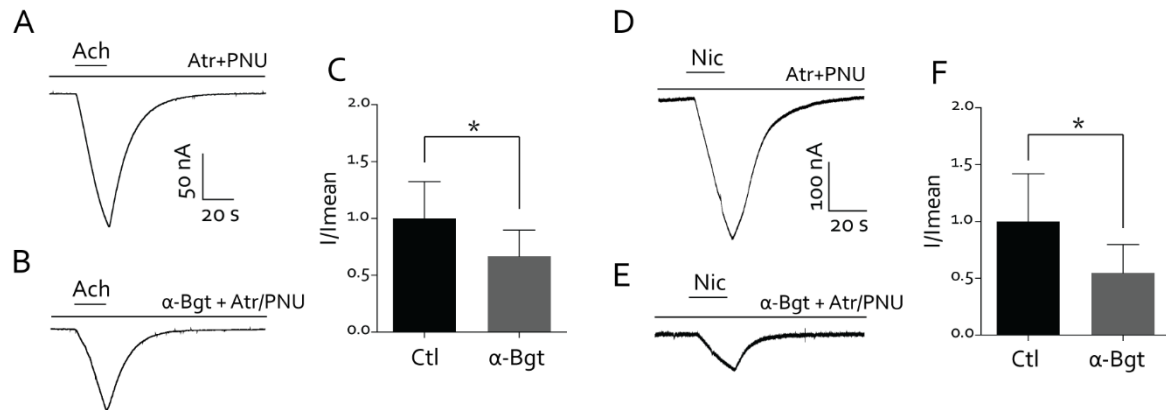


Figure 34 : Etude des courants induits par l'ACh et la Nic sur des ovocytes microtransplantés avec des membranes de synganglia de tique, et effet de l'α-Bgt sur leurs amplitudes.

Courant induit par l'ACh (1 mM) en absence (A) ou en présence (B) de 10 nM d'α-Bgt (avec PNU 1 μM et atropine (Atr) 0,5 μM). (C) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'ACh en absence (Ctl) ou en présence de 10 nM d'α-Bgt (n = 6, *p < 0,05, * = différence significative). Courant induit par la Nic (1 mM) en absence (D) ou en présence (E) de 10 nM d'α-Bgt (avec PNU 1 μM et Atr 0,5 μM). (F) L'histogramme représente le courant moyen induit par la Nic en absence (Ctl) ou en présence de 10 nM d'α-Bgt (n = 10, *p < 0,05, * = différence significative). Le trait dessiné au-dessus de chaque courant représente l'application de la molécule et le temps de perfusion est de 20 sec. Les données sont représentées en tant que moyenne ± S.E.M.

Deux autres antagonistes, la mécamylamine (Mec) et la méthyllycaconitine (MLA), ont été testés sur les ovocytes microtransplantés. L'activité inhibitrice de la Mec a été décrite sur des récepteurs insensibles à l'α-Bgt chez la blatte *P. americana* (Courjaret, Grolleau, and Lapied 2003; Thany, Courjaret, and Lapied 2008). Pour la MLA, des études de liaison par affinité ont montré qu'elle se lie avec une haute affinité aux récepteurs homomérique α₇, sensibles à l'α-Bgt (Davies et al. 1999). Ces deux molécules sont testées de la même façon que pour les expériences avec l'α-Bgt, un bain est appliqué avec chacun des antagonistes, en présence de 0,5 μM d'atropine et de 1 μM de PNU-120596. Les courants induits par l'ACh (1 mM) ne sont pas modifiés suite au prétraitement avec 1 μM de Mec (n = 6, p > 0,05, Figure 35 A, B et C), ou 10 nM de MLA (n = 6, p > 0,05, Figure 35 D, E et F). Par contre,

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

pour la Nic (1 mM), la Mec n'a aucun effet ($n = 9, p > 0,05$, **Figure 36 A, B et C**), mais la MLA entraîne une inhibition de 41 % des courants ($n = 6, *p < 0,05$, **Figure 36 A, B et C**). Ces résultats mettent en évidence la présence de différents sous-types de nAChRs parmi les populations sensibles et insensibles à l' α -Bgt, notamment la présence de sous-types $\alpha 7$ homomériques sensibles à la MLA.

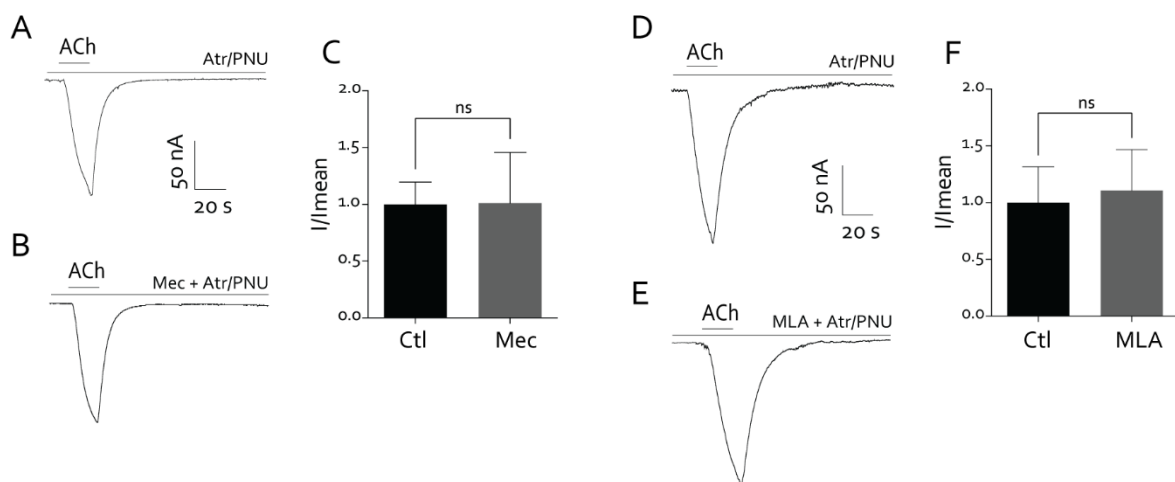


Figure 35 : Effet de modulation de la mécamylamine (Mec) et de la méthyllycaconitine (MLA) sur les courants induits par l'ACh (1 mM) en ovocyte de xénope microtransplantés avec des membranes de synganglion.

Courant induit par l'ACh (1 mM) en absence (A) ou en présence (B) de 1 μ M de Mec. (C) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'ACh en absence (Ctl) ou en présence de 1 μ M de Mec ($n = 6, p > 0,05$, ns = non significatif). Courant induit par l'ACh (1 mM) en absence (D) ou en présence de 10 nM de MLA. (F) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'ACh en absence (Ctl) ou en présence de 10 nM de MLA ($n = 6, p > 0,05$, ns = non significatif). Le trait dessiné au-dessus de chaque courant représente l'application de la molécule et le temps de perfusion est de 20 sec. Les données sont représentées en tant que moyenne \pm S.E.M.

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

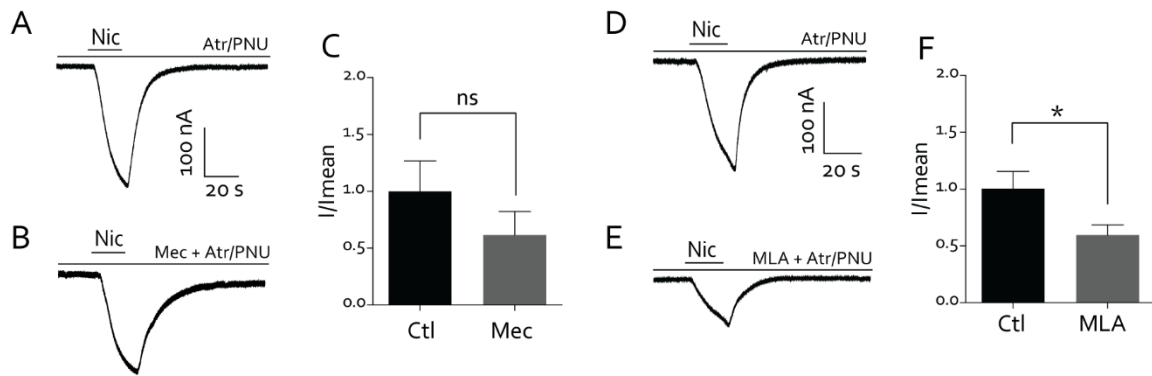


Figure 36 : Effet de modulation de la mécamylamine (Mec) et de la méthyllycaconitine (MLA) sur les courants induits par la nicotine (Nic, 1 mM) en ovocyte de xénope microtransplantés avec des membranes de synganglion.

Courant induit par la Nic (1 mM) en absence (A) ou en présence (B) de 1 μ M de Mec. (C) L'histogramme représente le courant moyen induit par la Nic en absence (Ctl) ou en présence de 1 μ M de Mec ($n = 9$, $p > 0,05$, ns = non significatif). Courant induit par la Nic (1 mM) en absence (D) ou en présence (E) de 10 nM de MLA. (F) L'histogramme représente le courant moyen induit par la Nic en absence (Ctl) ou en présence de 10 nM de MLA ($n = 6$, $*p > 0,05$, * = différence significative). Le trait dessiné au-dessus de chaque courant représente l'application de la molécule et le temps de perfusion est de 20 sec. Les données sont représentées en tant que moyenne \pm S.E.M.

2.2 - Etude de la sensibilité des nAChRs natifs de la tique *Ixodes ricinus* aux néonicotinoïdes

Au cours de ces travaux, la sensibilité des nAChRs natifs de la tique *I. ricinus* pour les néonicotinoïdes suivants a été étudiée : la clothianidine (CLT), l'imidaclopride (IMI), le thiaméthoxame (TMX) et l'acétamipride (ACE). Dans un premier temps, l'application de CLT (1 mM) en présence d'atropine (0,5 μ M) a induit une réponse avec une amplitude moyenne de $-4,8 \pm 1$ nA (**Figure 37 A**). Puis, en présence d'atropine et de PNU-120596 (0,5 μ M et 1 μ M), les courants induits par la CLT sont augmentés à $-153,5 \pm 53$ nA et significativement différents comparés aux courants obtenus en absence de PNU-120596 ($n = 9$, $p^* < 0,05$, **Figure 37 A, B, C**). Lors de l'application d'IMI (1 mM) sur les ovocytes microtransplantés en absence ou en présence de PNU-120596 (1 μ M), les amplitudes de courants ont été respectivement de $-4,3 \pm 1$ nA et $-15,1 \pm 3$ nA ($n = 19$, $p^* < 0,05$, **Figure**

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

37 D, E, F). Pour les tests menés avec le TMX (1 mM), en absence de PNU-120596 (1 μ M) l'amplitude moyenne des réponses induites sont de $-4,1 \pm 1$ nA et en présence de PNU-120596 de -19 ± 4 nA (n = 14, *p < 0,05, **Figure 37 G, H, I**). Enfin, l'utilisation d'ACE sur les ovocytes contenant les préparations membranaires de synganglia de tiques induit des réponses d'amplitude moyenne de $-4,7 \pm 1$ nA en absence de PNU-120596 et en présence de ce modulateur de $-18,2 \pm 4$ nA (n = 20, *p < 0,05, **Figure 37 J, K, L**). Les résultats obtenus en absence de PNU-120596 montrent une faible activation des nAChRs natifs de la tique avec une amplitude de courant maximale enregistrée n'excédant pas les 5 nA. Mais en présence du modulateur allostérique, une augmentation significative des courants induits est observée pour tous les néonicotinoïdes testés. L'effet le plus important a été observé lors de l'application de la CLT sur les ovocytes microtransplantés avec des membranes de synganglion, avec un courant moyen 32 fois plus important que le courant contrôle (**Figure 37**).

Ces résultats montrent que les nAChRs natifs de la tique sont peu sensibles aux néonicotinoïdes testés (CLT, IMI, TMX, ACE), et que l'effet agoniste de ces néonicotinoïdes peut être amplifié lors de l'application du modulateur allostérique positif, le PNU-120596, comme cela a été précédemment réalisé pour les courants induits par l'ACh et la Nic.

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

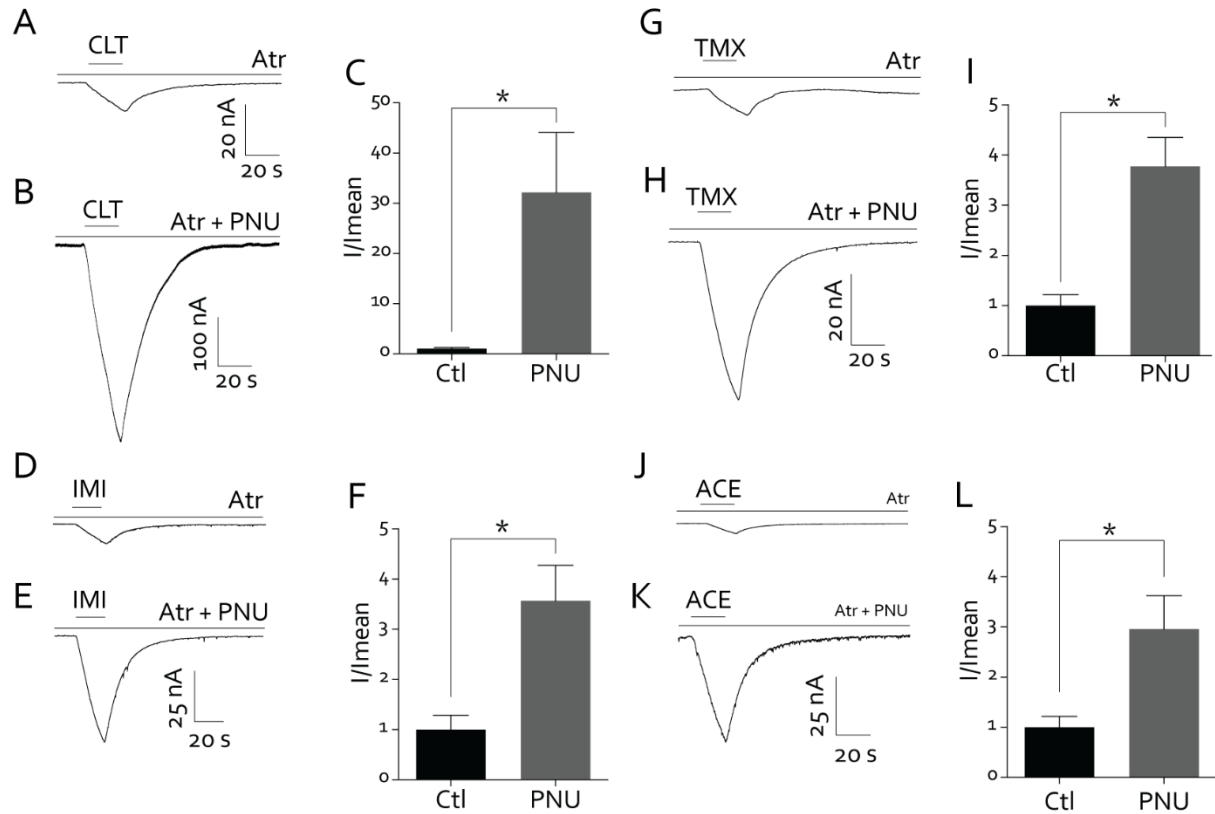


Figure 37 : Etude des courants induits par plusieurs néonicotinoïdes (Clothianidine : CLT, Imidaclopride : IMI, Thiaméthoxame : TMX, Acétamipride : ACE) sur des ovocytes microtransplantés avec des membranes du synganglion de la tique.

Courant induit par la CLT (1 mM) en absence (A) ou en présence (B) de 1 μM de PNU-120596. (C) L'histogramme représente le courant moyen induit par la CLT en absence (Ctl) ou en présence de 1 μM de PNU (n = 9, *p < 0,05, * = différence significative). Courant induit par l'IMI (1 mM) en absence (D) ou en présence (E) de 1 μM de PNU (courant contrôle). (F) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'IMI en absence (Ctl) ou en présence de 1 μM de PNU (n = 19, *p < 0,05, * = différence significative). Courant induit par la TMX (1 mM) en absence (G) ou en présence (H) de 1 μM de PNU. (I) L'histogramme représente le courant moyen induit par la TMX en absence (Ctl) ou en présence de 1 μM de PNU (n = 14, *p < 0,05, * = différence significative). Courant induit par la TMX (1 mM) en absence (J) ou en présence (K) de 1 μM de PNU. (L) L'histogramme représente le courant moyen induit par la TMX en absence (Ctl) ou en présence de 1 μM de PNU (n = 20, *p < 0,05, * = différence significative). Le trait dessiné au-dessus de chaque courant représente l'application de la molécule et le temps de perfusion est de 20 sec. Les données sont représentées en tant que moyenne ± S.E.M.

2.3 - Effet du DEET et du flupyradifurone sur les nAChRs natifs de la tique *Ixodes ricinus*

Pour compléter la caractérisation des nAChRs présents dans les membranes du synganglion de la tique ainsi que le screening de molécules pouvant agir sur ces récepteurs, deux autres molécules déjà présentes sur le marché ont été testées dans le but d'observer leur effet pharmacologique au niveau de ces récepteurs. Nous avons décidé d'utiliser le DEET (N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide), répulsif très utilisé dans le monde. Il a été démontré qu'il possède une activité au niveau du système nerveux de certains organismes (Swale et al. 2014), notamment qu'il peut inhiber l'activité d'enzymes, telles que la butyrylcholinestérase et l'AChE (Corbel, Stankiewicz, Pennetier, Fournier, Stojan, Girard, Dimitrov, Molgo, et al. 2009). La seconde molécule testée est le flupyradifurone (FLU), un pesticide de nouvelle génération appartenant à la famille des buténolides et agissant sur les nAChRs (Nauen, Jeschke, Velten, Beck, Ebbinghaus-Kintscher, et al. 2015).

Dans un premier temps, l'effet agoniste des deux molécules a été testé en présence d'atropine et de PNU-120596 (**Figure 38**). L'utilisation de DEET (1 mM) n'a pas montré d'effet agoniste (**Figure 38 C**), contrairement au FLU (1 mM) qui génère un courant de l'ordre de $-78,8 \pm 25$ nA (**Figure 38 D**). Les courbes doses réponses montrent que les EC₅₀ déterminées sont de 276 μ M pour l'ACh, de 149 μ M pour la Nic et de 521 μ M pour le FLU (**Figure 38 E**). Dans un second temps, nous avons évalué l'effet modulateur de ces deux composés sur les courants induits par l'ACh et la Nic en présence d'atropine (0,5 μ M) et de PNU-120596 (1 μ M). Le pré-traitement du FLU seul (5 nM) ne modifie pas les courants induits par l'ACh à 1 mM (n = 6, p > 0,05, **Figure 39 B**) ou la Nic à 1 mM (n = 8, p > 0,05, **Figure 39 E**). Au contraire, le DEET appliqué en bain à 5 nM est capable d'inhiber la réponse à la Nic de 45 % (n = 9, *p < 0,05, **Figure 39 D**), mais n'a aucun effet sur la réponse à l'ACh (n = 9, p > 0,05, **Figure 39 A**). La combinaison des deux molécules montre un effet d'inhibition sur la réponse à la Nic de 46 % (n = 7, *p < 0,05, **Figure 39 F**) mais pas sur celle à l'ACh (n = 8, p > 0,05, **Figure 39 C**). Ainsi, un

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

effet antagoniste du DEET est observé sur les réponses à la Nic (1 mM) seulement. L'effet antagoniste du mélange observé quant à lui pourrait correspondre à un effet additif dû à la présence du DEET.

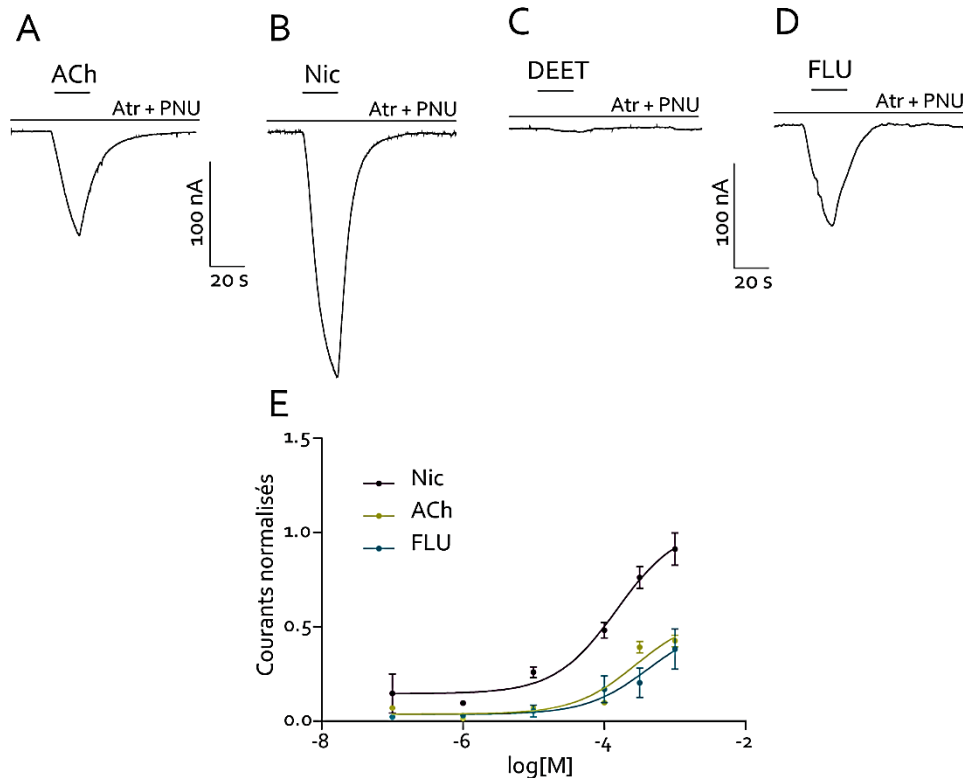


Figure 38 : Etude des courants induits par plusieurs agonistes comme l'ACh, la Nic, comparé aux réponses engendrées par deux pesticides : le DEET ainsi que le flupyradifurone (FLU), appliqués sur des ovocytes microtransplantés avec des membranes de synganglia.

Exemple de courants induits par 1 mM d'ACh (A), de Nic (B), de DEET (C), et de FLU (D). Le trait dessiné au-dessus de chaque courant représente l'application de la molécule et le temps de perfusion est de 20 sec. (E) Représentation d'une courbe dose réponse pour les agonistes ACh, Nic et FLU. L'axe des abscisses représente les concentrations testées (M) pour chaque molécule sous forme logarithmique (log[M]). Chaque point illustre les amplitudes des réponses qui sont normalisées en fonction de l'intensité maximale (I_{max}) de la réponse à la Nic (1 mM). Les mesures électrophysiologiques ont été effectuées en présence d'atropine (Atr) à 0,5 μM et de PNU-120596 à 1 μM, pour $n = 15$ ovocytes.

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

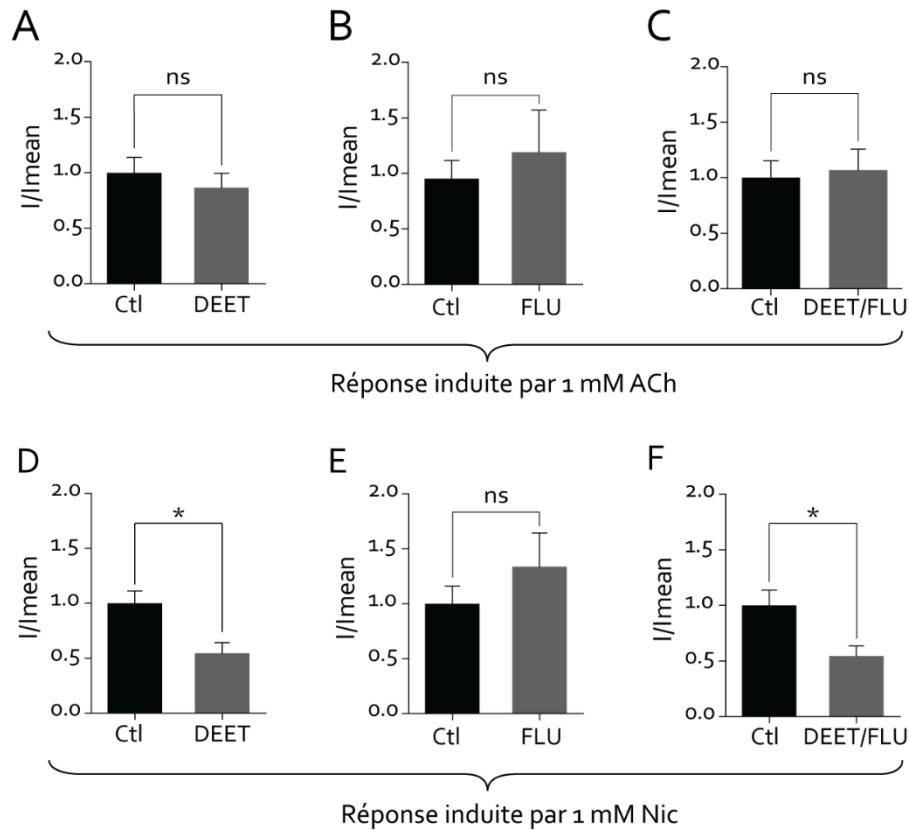


Figure 39 : Représentation de l'effet en prétraitement du DEET et du flupyradifurone (FLU) à 5 nM sur la réponse à l'ACh (1 mM) ou à la nicotine (1 mM).

(A) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'ACh en absence (Ctl) ou en présence (DEET) de 5 nM de DEET (n= 9, $p > 0,05$, ns = non significatif). (B) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'ACh en absence (Ctl) ou en présence (FLU) de 5 nM de FLU (n = 6, $p > 0,05$, ns = non significatif). (C) L'histogramme représente le courant moyen induit par l'ACh en absence (Ctl) ou en présence (DEET/FLU) de 5 nM de la combinaison de DEET et FLU (n = 8, $p > 0,05$, ns = non significatif). (D) L'histogramme représente le courant moyen induit par la Nic en absence (Ctl) ou en présence (DEET) de 5 nM de DEET (n = 9, $*p < 0,05$, * = différence significative). (E) L'histogramme représente le courant moyen induit par la Nic en absence (Ctl) ou en présence (FLU) de 5 nM de FLU (n = 8, $p > 0,05$, ns = non significatif). (F) L'histogramme représente le courant moyen induit par la Nic en absence (Ctl) ou en présence (DEET/FLU) de 5 nM de la combinaison de DEET et FLU (n = 7, $*p < 0,05$, * = différence significative). Les données sont représentées en tant que moyenne \pm S.E.M.

3 - Conclusion sur la caractérisation des propriétés pharmacologiques des nAChRs exprimés dans le synganglion de la tique par la technique de microtransplantation

3.1 - Caractérisation pharmacologique des nAChRs

3.1.1 - Présence de nAChRs dans le synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

Les enregistrements obtenus par la technique de TEVC montrent que les courants induits par l'ACh et la Nic ont une cinétique de désensibilisation similaire à celle décrite chez le puceron du pois (Crespin et al. 2016). L'affinité de l' α -Bgt sur les nAChRs a été démontrée chez les vertébrés, notamment au niveau de préparation de membranes de cerveau de rat et de l'organe électrique de *Torpedo* (Lukas et al. 1999; Young, Herbette, and Skita 2003). Des études pharmacologiques ont mis en évidence la présence de populations de nAChRs sensibles et insensibles à l' α -Bgt chez différentes espèces d'arthropodes telles que la drosophile *D. melanogaster*, (Schloss et al. 1991) ou chez la blatte américaine *P. americana*, (Salgado and Saar 2004). L'utilisation de cette toxine a montré qu'une population de récepteurs sensibles à l' α -Bgt est présente dans le synganglion de la tique *I. ricinus*, notamment par l'inhibition partielle des courants induits par l'ACh et la Nic. Cela a pu être confirmé par le marquage des préparations membranaires, ainsi que par l'utilisation de Mec et de MLA. En effet, l'inhibition de la MLA sur les réponses induites par la Nic a été constaté et confirme ainsi la présence de récepteurs nicotiniques sensibles à l' α -Bgt au sein des extraits membranaires du synganglion de la tique *I. ricinus*.

3.1.2 - Sensibilité des nAChRs aux néonicotinoïdes

Malgré la polémique qui entoure l'utilisation des pesticides néonicotinoïdes et le fait que les arachnides soient décrits comme peu sensibles (Erdmanis et al. 2012; Song et al. 2009; Lees et al. 2014), les néonicotinoïdes sont des molécules connues pour se lier aux nAChRs des insectes et plus

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

largement des arthropodes (Tan, Galligan, and Hollingworth 2007; Thany 2009; Kiriya et al. 2003). Ainsi l'étude de ces pesticides dans le but de déterminer la pharmacologie des nAChRs de la tique *I. ricinus* est intéressante.

Dans un premier temps, l'application des néonicotinoïdes seuls (CLT, IMI, TMX et ACE) montre que ces molécules sont de faibles agonistes des nAChRs de la tique *I. ricinus*. En effet, sans l'addition de PNU-120596, les amplitudes enregistrées ne dépassent pas les 5 nA. Malgré cela, les courants observés montrent qu'au sein des récepteurs nicotiniques présents dans le synganglion de la tique *I. ricinus*, il existe des sous-types de nAChRs sensibles aux pesticides néonicotinoïdes. La sensibilité à ces pesticides a déjà été largement observée chez plusieurs espèces d'insectes par exemple *P. americana* (Tan, Galligan, and Hollingworth 2007; Thany 2009), *M. domestica* (Kiriya et al. 2003), *D. melanogaster* et *Homalodisca coagulata* (Honda, Tomizawa, and Casida 2006) ou encore *A. pisum* (Crespin et al. 2016). De plus, plusieurs études ont montré que la liaison des néonicotinoïdes est spécifique à certains sous-types de récepteurs nicotiniques chez les insectes. En effet, chez plusieurs espèces de pucerons (*A. pisum*, *M. persicae* et *A. craccivora*), l'IMI se lie aux nAChRs insensibles à l' α -Bgt (Taillebois et al. 2014; Wiesner and Kayser 2000). Également, chez la blatte *P. americana*, l'IMI se lie préférentiellement aux récepteurs insensibles à l' α -Bgt, définis comme nAChR1 (Buckingham et al. 1997; Courjaret and Lapied 2001). Par contre, la liaison du TMX, étudiée chez ces mêmes espèces de pucerons, est observée au niveau des récepteurs sensibles à l' α -Bgt (Taillebois et al. 2014; Wiesner and Kayser 2000). Dans le cas de la CLT et de l'ACE, la liaison aux deux sous-types de nAChRs (sensibles, nAChR1 et insensibles, nAChR2 à IMI) a été observée en patch-clamp sur les neurones DUM de *P. americana* (Bodereau-Dubois et al. 2012; Thany 2009). Ainsi, les effets agonistes des différents néonicotinoïdes expérimentés chez la tique *I. ricinus*, sur les ovocytes microtransplantés avec les extraits membranaires de synganglion, sont probablement influencés par les différents sous-types de nAChRs exprimés à la membrane des ovocytes. Malgré tout, la comparaison entre les effets rencontrés chez la tique et chez les insectes est à tempérer, car des variations d'activités des

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

néonicotinoïdes ont déjà été constatées entre des espèces d'insectes (Wiesner and Kayser 2000) (Kiryama et al. 2003) (Zhang, Tomizawa, and Casida 2004) (Honda, Tomizawa, and Casida 2006) (Thany 2009) (Bodereau-Dubois et al. 2012) (Taillebois et al. 2014).

Nous avons pu observer que la supplémentation du SOS avec 1 μ M de PNU-120596 permet d'augmenter significativement l'amplitude des courants induits par les néonicotinoïdes. De plus, l'effet du PNU-120596 sur les réponses aux différents composés a permis de les séparer en deux catégories : l'IMI, l'ACE et le TMX dont l'amplitude a été augmentée entre 3 à 4 fois comparé au courant contrôle ; et la CLT, dont l'amplitude a été multipliée par 32. Ainsi, la CLT pourrait être considéré comme un meilleur agoniste comparé aux autres néonicotinoïdes testés. L'action comme un agoniste total de la CLT a été démontrée sur des neurones isolés provenant de ganglions thoraciques de *P. americana* (Tan, Galligan, and Hollingworth 2007). De plus, l'effet super-agoniste de la CLT a également été observé suite à son application sur des cellules neuronales de larves de *D. melanogaster* en patch-clamp, comparé aux réponses induite par l'ACh et l'IMI (Brown et al. 2006). Ces résultats peuvent également nous faire réfléchir à l'utilisation d'une formulation contenant un pesticide actif sur les nAChRs de la tique *I. ricinus* additionné avec un modulateur allostérique positif (comme le PNU-120596) en tant que moyen pour lutter contre ce parasite. Pour compléter cette étude, l'activité neurotoxique d'un tel mélange pourrait être testée *in-vivo*, dans le but de confirmer l'augmentation de toxicité de la CLT sur des tiques vivantes comparé à l'utilisation de la CLT seule.

3.1.3 - Sensibilité des nAChRs au DEET et au flupyradifurone

Deux autres molécules, le DEET et le FLU, ont été testées dans les mêmes conditions expérimentales définies précédemment (en présence d'atropine et de PNU-120596).

Des études ont été menées sur l'activité au niveau du système nerveux du DEET chez différents types d'organismes. Une EC₅₀ de 120 μ M a été déterminée au niveau du système nerveux

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

de la mouche *M. domestica* (Swale et al. 2014). Également, une inhibition des canaux sodiques a été constatée ($IC_{50} = 700 \mu M$) suite à l'étude en patch-clamp des neurones corticaux de rat ainsi que l'inhibition des canaux potassiques dont l' EC_{50} est 6 fois plus faible que celle des canaux Na^+ (Swale et al. 2014). Une autre étude a montré que le DEET, appliqué à de faibles doses (10 nM) sur neurone DUM de *P. americana*, est capable de se fixer au niveau du site de liaison allostérique des mAChRs et permet d'augmenter l'effet anti-AChE d'un carbamate, le propoxur (Abd-Ella et al. 2015). Le DEET aurait un effet de modulation allostérique positive au niveau des mAChRs des neurones DUM de la blatte ce qui augmenterait les taux de calcium intracellulaire suite à l'activation des mAChRs (Abd-Ella et al. 2015; Corbel, Stankiewicz, Pannetier, Fournier, Stojan, Girard, Dimitrov, Molgó, et al. 2009). Lors de notre étude, le pré-traitement avec une faible concentration de DEET (5 nM) a entraîné une inhibition des courants induits par la Nic (1 mM). Par contre, aucun effet n'a été observé sur les courants induits par l'ACh. La conclusion par rapport à l'action du DEET sur les récepteurs présents dans les extraits membranaires microtransplantés en ovocyte n'est pas facile à établir. En effet, la présence de certains régulateurs natifs des récepteurs peut influencer les réponses obtenues suite aux pré-traitements, en interagissant avec les molécules appliquées sur les ovocytes (Eusebi et al. 2009).

Comparé à cela, le FLU a montré un effet agoniste à 1 mM. Par contre, les expériences effectuées avec l'application de faibles doses de FLU (5 nM) au niveau des ovocytes n'ont pas montré d'effet, ce qui pourrait indiquer qu'il n'y a pas d'effet allostérique ou de modulation de ce nouveau pesticide au niveau des nAChRs étudiés chez la tique *I. ricinus*. Cette molécule a été décrite comme neurotoxique chez plusieurs espèces d'insectes, notamment par des expériences de toxicité menées sur des larves d'anophèles *Anopheles darlingi* ($LC_{50} = 1,18 \mu g/mL$ à 48h d'exposition pour le flupyradifurone), (da Silva Mesquita et al. 2020). Une autre étude de 2015 conclue à la sensibilité des nAChRs d'insectes grâce à des études de liaison par affinité sur des préparations membranaires de tête de la mouche *M. domestica*, ainsi que des mesures électrophysiologiques sur des neurones isolés de *Spodoptera frugiperda* (Nauen, Jeschke, Velten, Beck, Ebbinghaus-Kintscher, et al. 2015).

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

Lors de l'application combinée de DEET et de FLU (solution à 5 nM), une inhibition similaire à celle obtenue avec le DEET seul a été constatée sur la réponse induite par la Nic (1 mM). Ainsi nous en avons déduit que cet effet était seulement dû à la présence de DEET dans la solution et que le FLU n'apportait pas d'effet supplémentaire pouvant impacter la réponse à la Nic. La combinaison de deux ou plusieurs molécules à caractère neurotoxique est souvent utilisée dans le but d'obtenir le même effet neurotoxique ou bien de l'augmenter avec les combinaisons de molécules, en utilisant le moins de produit actif possible (Brindley and Selim 1984). Cet effet de synergie a été étudié chez plusieurs espèces au niveau toxicologique, notamment sur les insectes vecteurs de maladies, comme pour des larves d'*Aedes aegypti*, de *Culex quinquefasciatus* (Ahmed and Matsumura 2012; Corbel et al. 2004), ou de ravageurs de cultures comme chez la noctuelle rayée *Spodoptera litura* ou chez le puceron du pois *A. pisum* (Taillebois et al. 2020; Ahmad, Saleem, and Sayyed 2009). Pour ces insectes, la méthode de lutte est souvent composée de traitements préventifs menant au développement de résistances dû à l'application d'une forte dose d'un seul pesticide. La combinaison entre le DEET et le FLU n'a pas montré de différence comparée à l'utilisation du DEET seul à faible concentration. Il pourrait être intéressant d'utiliser du DEET en faible concentration combiné à l'utilisation de FLU en tant qu'agoniste dans le but d'observer s'il n'y a pas un effet de modulation positive du DEET sur la réponse induite par le FLU.

3.2 - Mise au point de la technique de microtransplantation de préparations membranaires pour l'étude des nAChRs natifs de la tique

L'étude de l'activité électrophysiologique de récepteurs natifs suite à la microtransplantation d'extraits membranaires en ovocyte de xénope est utilisée depuis une vingtaine d'années sur différents modèles (Marsal, Tigyi, and Miledi 1995; Eusebi et al. 2009; Miledi et al. 2002; Miledi, Palma, and Eusebi 2006; Palma et al. 2007). Une des premières études qui a permis de décrire la présence de nAChRs suite à une microtransplantation a été effectuée sur des extraits protéiques de l'organe électrique de la torpille (*Torpedo californica*), (Marsal, Tigyi, and Miledi 1995). Par la suite, la technique a été appliquée sur les modèles mammifères afin d'étudier l'effet de molécules neurotoxiques sur des protéines membranaires cérébrales (Miledi et al. 2002; Palma et al. 2007; Eusebi et al. 2009). Dans plusieurs études, des protéines extraites de cerveaux de patients atteints d'épilepsie ont pu être microtransplantées en ovocyte de xénope permettant d'obtenir des récepteurs au GABA fonctionnels sur lesquels des médicaments, tels que le lévétiracétam ou le flunitrazépam ont été testés (Miledi et al. 2002; Palma et al. 2007). Des extractions à partir de cultures de cellules HEK (Human Embryonic Kidney) exprimant des récepteurs humains (de type nAChR $\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$ ou glutamate GLUR₁) ont également permis d'obtenir des récepteurs fonctionnels suite à leur microtransplantation en ovocytes de xénope (Miledi, Palma, and Eusebi 2006). Plus récemment, cette technique a été appliquée à de nouveaux types d'organismes comme l'axolotl (*Ambystoma mexicanum*), (Reyes-Ruiz et al. 2013). Cela a permis de caractériser la présence de deux types de récepteurs GABA au sein des membranes provenant du cerveau de l'axolotl grâce à leur différences pharmacologiques (Reyes-Ruiz et al. 2013). Cette approche a également permis de tester l'effet du DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane), ciblant les canaux sodiques, et de son métabolite non-neurotoxique, le DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène), sur des protéines provenant de la neurolemme du rat (Murenzi et al. 2017).

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

Actuellement, une seule étude a montré l'utilisation de cette technique sur un modèle d'arthropode (Crespin et al. 2016). Ces travaux menés sur le puceron du pois (*A. pisum*) ont permis une première caractérisation pharmacologique de nAChRs présents dans les extraits membranaires et notamment la détermination de leur sensibilité à des insecticides de type néonicotinoïde (Crespin et al. 2016). Cependant les courants cholinergiques obtenus suite à l'application de différents agonistes étaient de faibles amplitudes, ne dépassant pas 10 nA (*e.g.* réponse de 4 nA à l'ACh 1 mM), (Crespin et al. 2016). Ces données ont montré la nécessité d'optimiser la technique en fonction des modèles biologiques. Dans ce contexte, les travaux menés pendant cette thèse nous ont permis de réaliser pour la première fois la microtransplantation de protéines extraites du synganglion de la tique *I. ricinus* en ovocyte de xénope. Nous avons obtenu des nAChRs fonctionnels permettant ainsi leur caractérisation pharmacologique. La mise au point de ce protocole en utilisant les préparations membranaires de la tique *I. ricinus* a donné des résultats encourageant pour la suite de la caractérisation des nAChRs natifs de la tique (*e.g.*, réponse de 75 nA pour l'ACh 1 mM, **Figure 28**).

Nous avons déterminé qu'il est nécessaire de bloquer les mAChRs dans le but d'étudier les nAChRs fonctionnels présents au niveau de la membrane des ovocytes. En effet, la présence de nAChRs et de mAChRs chez d'autres espèces de tiques, la tique à pattes noires *Ixodes scapularis* (Egekwu et al. 2014; Gulia-Nuss et al. 2016), ainsi que chez la tique du chien *Rhipicephalus sanguineus* (Lees, Woods, and Bowman 2010), a été déterminée par des études de transcriptomique. D'après une étude de 2013, chez plusieurs espèces d'arthropodes, deux types de mAChRs sont présents et définis de type A (bloqué par l'atropine) et de type B (insensible à l'atropine), (Collin et al. 2013). Chez *I. ricinus*, nous avons observé une inhibition complète des courants muscariniques en présence d'atropine, suggérant la présence de mAChRs de type A. De plus, de manière similaire à ce qui a été observé chez le puceron (Crespin et al. 2016), les courants induits par la Nic seule ne sont pas stables. Cependant, l'ajout d'atropine permet la stabilisation des courants et donc l'amélioration des conditions d'enregistrement de l'activité des récepteurs.

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

L'optimisation des conditions expérimentales a été nécessaire pour poursuivre la caractérisation pharmacologique des nAChRs de la tique. En effet, afin de visualiser un effet antagoniste sur les réponses aux agonistes de référence (ACh et Nic) des courants de plus forte amplitude étaient nécessaires. Grâce à l'application de PNU-120596, nous avons démontré que les amplitudes des courants induits par l'ACh et par la Nic étaient significativement augmentées. En effet, le PNU-120596 est un modulateur allostérique positif de type II connu pour agir sur les nAChRs, notamment sur les récepteurs homomériques composés de la sous-unité $\alpha 7$ (Kalappa and Uteshev 2013). Il va permettre d'augmenter le temps d'activation, c'est à dire le temps d'ouverture du canal des récepteurs, lorsqu'ils sont stimulés par la fixation d'un agoniste (Kalappa and Uteshev 2013). L'utilisation de PNU-120596 sur les ovocytes microtransplantés avec les nAChRs natifs de la tique n'a pas changé les tendances de réponses électrophysiologiques observées, car l'utilisation d' α -Bgt montre le même effet en présence ou non de PNU-12096 (diminution partielle) pour les réponses induites par la Nic (1 mM).

Suite à cette optimisation, une variabilité au niveau des courants induits lors de l'étude d'ovocytes microtransplantés avec des membranes du synganglion a été observée au cours des enregistrements. Cette variabilité pourrait être causée par le système d'expression dans lequel sont étudiés les nAChRs de la tique. En effet, une étude de 2003 a montré une différence des réponses obtenues entre l'étude de récepteurs au glutamate (GLUR1) présents dans des lignées cellulaires (HEK) et ces mêmes récepteurs extraits et microtransplantés en ovocytes de xénope (Palma et al. 2003). L'application d'AMPA (ou α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) induit une désensibilisation des récepteurs GLUR1 plus rapide lors de l'étude de leur expression en ovocytes comparée à celles des cellules HEK (Palma et al. 2003). Ce phénomène pourrait être dû à la différence de signalisation cellulaire interne entre les ovocytes d'amphibien microtransplantés et les cellules de mammifères (Burton 1983; Kusano, Miledi, and Stinnakre 1982). Une autre hypothèse pourrait être la différence de densité en nAChRs au niveau des extraits membranaires injectés, qui n'est pas

Résultats et discussion : Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs du synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

quantifiée avant l'injection. De plus, le niveau d'expression des nAChRs natifs de la tique au niveau de la membrane des ovocytes peut être également un point limitant, comme cela a pu être constaté dans des études précédentes (Crespin et al. 2016; Eusebi et al. 2009). Cependant, les résultats observés grâce au marquage avec l' α -Bgt couplé à de l'Alexa-488 (technique employée également pour l'étude des nAChRs natifs d'*A. pisum*), (Crespin et al. 2016), nous a confirmé la présence de nAChRs au sein des membranes extraites du synganglion de la tique *I. ricinus*, et également la présence de récepteurs sensibles à cette toxine. D'une part, la visualisation des nAChRs sensibles à l' α -Bgt nous permet de valider la qualité des extraits membranaires avant leur injection (présence de récepteurs fonctionnels). D'autre part, l'intensité de la fluorescence induite par ce marquage ainsi que les mesures électrophysiologiques obtenues pourrait également être utilisées dans la quantification de récepteurs sensibles ou insensibles à l' α -Bgt présents au sein des extraits membranaires injectés.

Chapitre 2 : Etude *in vivo* du comportement d'évitement chez la tique *Ixodes ricinus*

1 - Comportement d'évitement des tiques face au DEET

L'utilisation du DEET pour se protéger des tiques est largement répandue et de nombreuses formulations de répulsifs, contenant entre 10 et 30% de DEET, sont commercialisées (Katz, Miller, and Hebert 2008; Diaz 2016). Également, une solution de DEET à 20% est généralement utilisée comme contrôle positif lors des tests d'efficacité de molécules répulsives potentielles (Carroll et al. 2004; Buchel et al. 2015; Soutar, Cohen, and Wall 2019). L'objectif des tests mis en place dans ce travail de thèse, est de tester l'efficacité d'un mélange DEET/FLU sur le comportement de la tique. Ainsi, dans notre étude, nous avons testé le DEET à une faible concentration (10%) ainsi qu'à la concentration de référence (20%).

Les tests de comportement montrent que la présence du DEET 10 % ne modifie pas les trajectoires des tiques sur la plateforme. Sur la **Figure 40 A** et **B**, on peut voir que les tiques parcourent l'ensemble de la plateforme. Les paramètres donnant une indication sur le passage des tiques après cette barrière chimique (**Figure 40 C** : taux de présence dans la zone 2, **D** : taux d'exploration) montrent également qu'il n'y a pas de différence significative entre les groupes contrôles et ceux en présence de DEET 10% ($n = 50$, $p > 0,05$). De plus, la distance totale parcourue par les tiques (**Figure 40 E**, $n = 50$, $p > 0,05$), leur durée d'immobilité (**Figure 40 F**, $n = 50$, $p > 0,05$) ainsi que leur vitesse moyenne (**Figure 40 G**, $n = 50$, $p > 0,05$) ne montrent pas de différence significative entre les groupes contrôles et DEET 10%. Ces résultats indiquent que les tiques en présence ou non de DEET 10% ont un comportement similaire lors des enregistrements. Pour finir, le temps où les tiques ont été non-visibility pendant l'enregistrement ne montrent pas non plus de différence entre les groupes contrôles

Résultats et discussion : Etude in vivo du comportement d'évitement chez la tique *Ixodes ricinus*

et DEET 10%, indiquant qu'il n'y a pas de biais d'enregistrement entre les deux tests réalisés (**Figure 40 H**, $n = 50$, $p > 0,05$).

Lors des enregistrements effectués avec le DEET 20%, les tiques ont montré un comportement d'évitement dans un premier temps au niveau de leur trajectoire (**Figure 41 A et B**). La trajectoire des tiques en présence d'éthanol (contrôle) montre qu'elles se sont déplacées sur toute la surface de la plateforme (**Figure 41 A**), contrairement aux groupes en présence de DEET 20% (**Figure 41 B**). Les résultats concernant le taux de présence dans la zone 2 montrent une diminution significative de 75% lorsque les tiques sont en présence de DEET 20% (**Figure 41 C**, $n = 45$, $*p < 0,05$) ainsi qu'une diminution de 50% du taux d'exploration sur l'ensemble de la plateforme (**Figure 41 D**, $n = 45$, $*p < 0,05$). De plus, la distance totale parcourue ainsi que la vitesse moyenne des tiques diminuent significativement (d'environ 53% et 45% respectivement) pour les tiques en présence de DEET 20% (**Figure 41 G**, $n = 45$, $*p < 0,05$). Lors de ces expériences, le temps où les tiques ont été immobiles et celui où elles n'ont pas été visibles pendant les enregistrements ne montrent pas de différences entre le contrôle et le DEET 20% (**Figure 41 F et H**, $n = 45$, $p > 0,05$).

L'ensemble de ces résultats démontre que le DEET à 20% présente un effet répulsif sur la tique *I. ricinus*. Ces résultats sont cohérents avec la littérature, permettant ainsi de valider le protocole expérimental. De plus, nos données démontrent que l'utilisation d'une dose de DEET à 10% ne permet pas d'obtenir un effet répulsif sur les tiques.

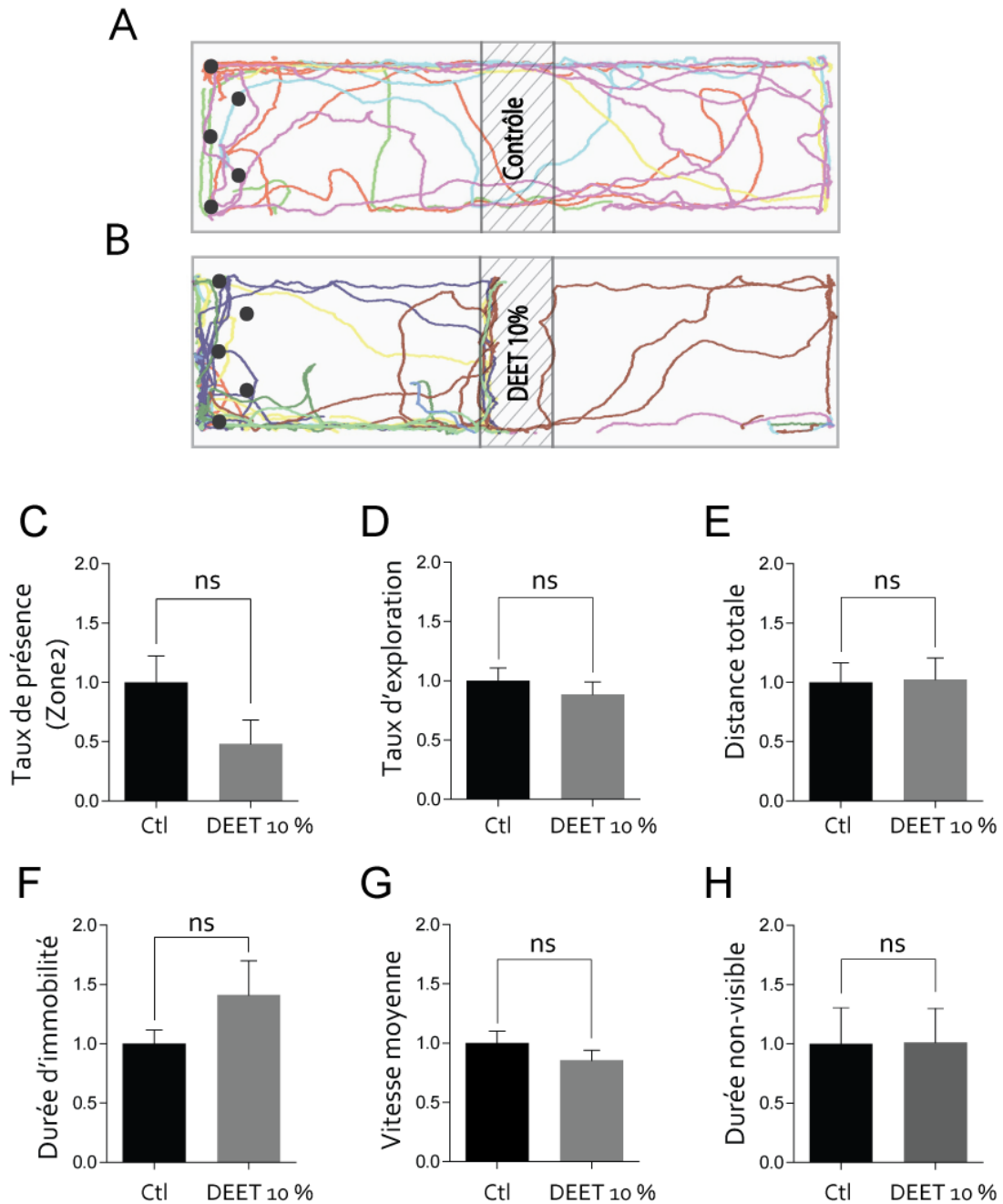


Figure 40 : Effet répulsif du DEET quand il est appliqué à une concentration de 10% au centre de la plateforme.

Schémas représentant le tracé du mouvement des tiques lors des enregistrements pour le contrôle (A) et pour le test en présence du DEET 10% (B). Les histogrammes représentant la comparaison entre les groupes contrôles (Ctl) et test (DEET 10%). Les données ont été normalisées en fonction de la moyenne des groupes contrôles. 50 tiques ont été utilisées (10 groupes de 5 tiques). Les histogrammes représentent la moyenne \pm S.E.M, ns = non significatif et * = différence significative. Plusieurs paramètres obtenus par l'analyse du logiciel ToxTrac ont été utilisés comme le taux de présence dans la zone 2 (C), le taux d'exploration (D), la distance totale (E), la durée totale d'immobilité (F), la vitesse moyenne (G) et la durée totale où les tiques ont été non-visibles (H).

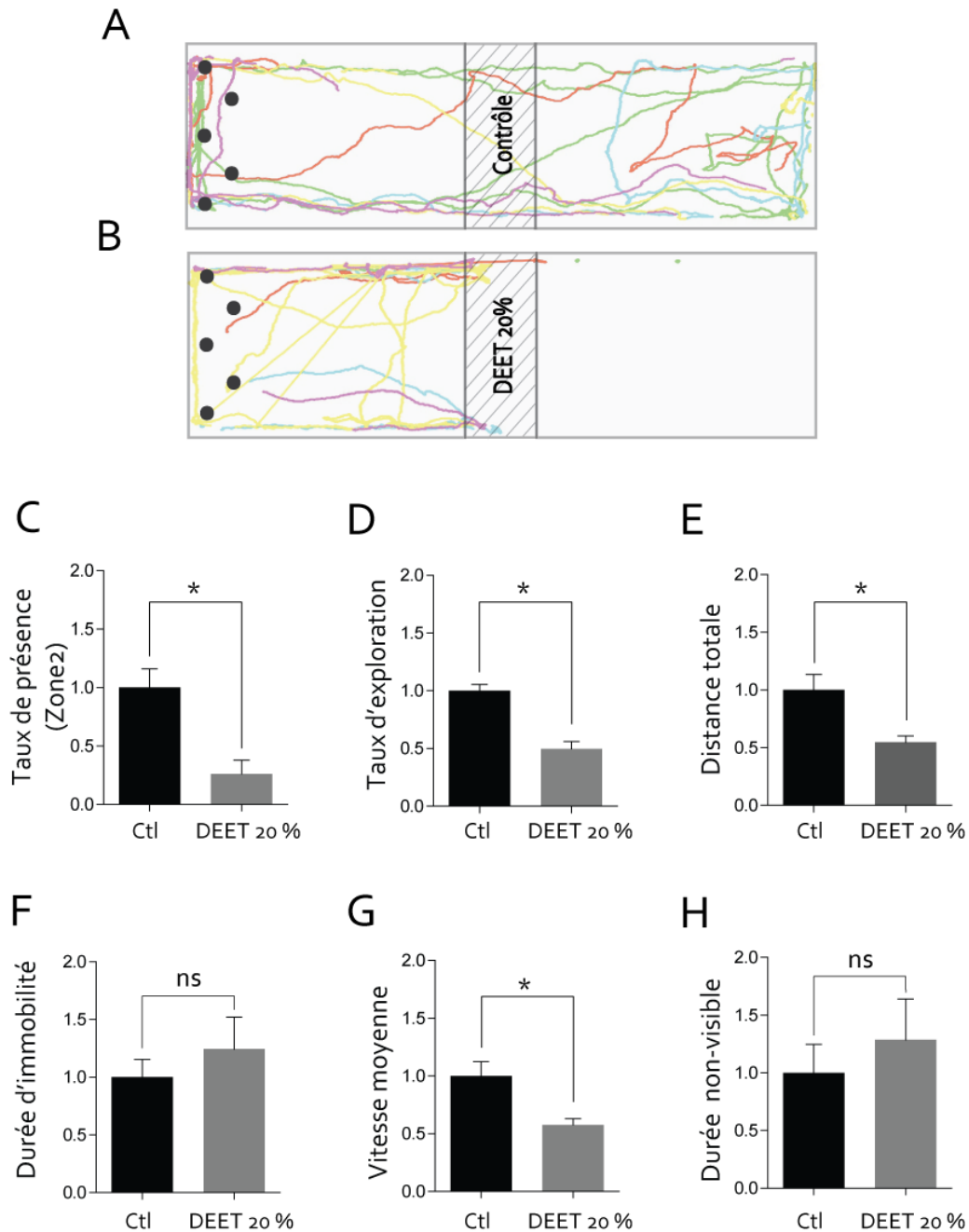


Figure 41 : Effet répulsif du DEET quand il est appliqué à une concentration de 20% au centre de la plateforme.

Schémas représentant le tracé du mouvement des tiques lors des enregistrements pour le contrôle (A) et pour le test en présence du DEET 20% (B). Les histogrammes représentant la comparaison entre les groupes contrôles (Ctl) et test (DEET 20%). Les données ont été normalisées en fonction de la moyenne des groupes contrôles. 50 tiques ont été utilisées (10 groupes de 5 tiques). Les histogrammes représentent la moyenne \pm S.E.M, ns = non significatif et * = différence significative. Plusieurs paramètres obtenus par l'analyse du logiciel ToxTrac ont été utilisés comme le taux de présence dans la zone 2 (C), le taux d'exploration (D), la distance totale (E), la durée totale d'immobilité (F), la vitesse moyenne (G) et la durée totale où les tiques ont été non-visibles (H).

2 - Effet du flupyradifurone (FLU)

Le FLU à une concentration de 10% ne montre pas d'effet sur les trajectoires des tiques quand les groupes contrôle et FLU 10% sont comparés (**Figure 42 A et B**). Ce résultat est confirmé par l'analyse du taux de présence dans la zone 2 et le taux d'exploration des tiques, qui ne montrent pas de différence significative entre les tiques en présence d'éthanol (contrôle) et de FLU 10% (**Figure 42 C et D**, $n = 30$, $p > 0,05$). Les paramètres décrivant la distance totale parcourue, le temps d'immobilité, et la vitesse moyenne ne montrent pas non plus de différence significative entre les groupes contrôles et FLU 10% (**Figure 42 E, F et G**, $n = 30$, $p > 0,05$). Pour finir, la durée où les tiques ne sont pas visibles lors de l'enregistrement n'est pas différente entre les deux groupes (**Figure 42 H**, $n = 30$, $p > 0,05$).

Lors de l'étude du FLU à la plus forte concentration (20%), aucun changement de comportement n'a été décelé chez les tiques testées. La plateforme a largement été explorée par les tiques, que ce soit en condition contrôle ou bien en présence de FLU (**Figure 43 A et B**). Les paramètres suivants : l'immobilité, la vitesse moyenne et la distance totale ne montrent pas de différence entre les tiques contrôles et les tiques en présence de FLU à 20% (**Figure 43 C, D, E, F et G**, $n = 30$, $p > 0,05$). De plus, aucun biais d'enregistrement n'est présent entre les groupes contrôles et FLU 20% car il n'y a pas de différence entre la durée où les tiques sont non-visibles sur la plateforme (**Figure 43 H**, $n = 30$, $p > 0,05$).

L'ensemble de ces résultats montrent qu'il n'y a pas d'effet répulsif sur les tiques lorsqu'elles sont en présence de FLU à 10 ou 20%.

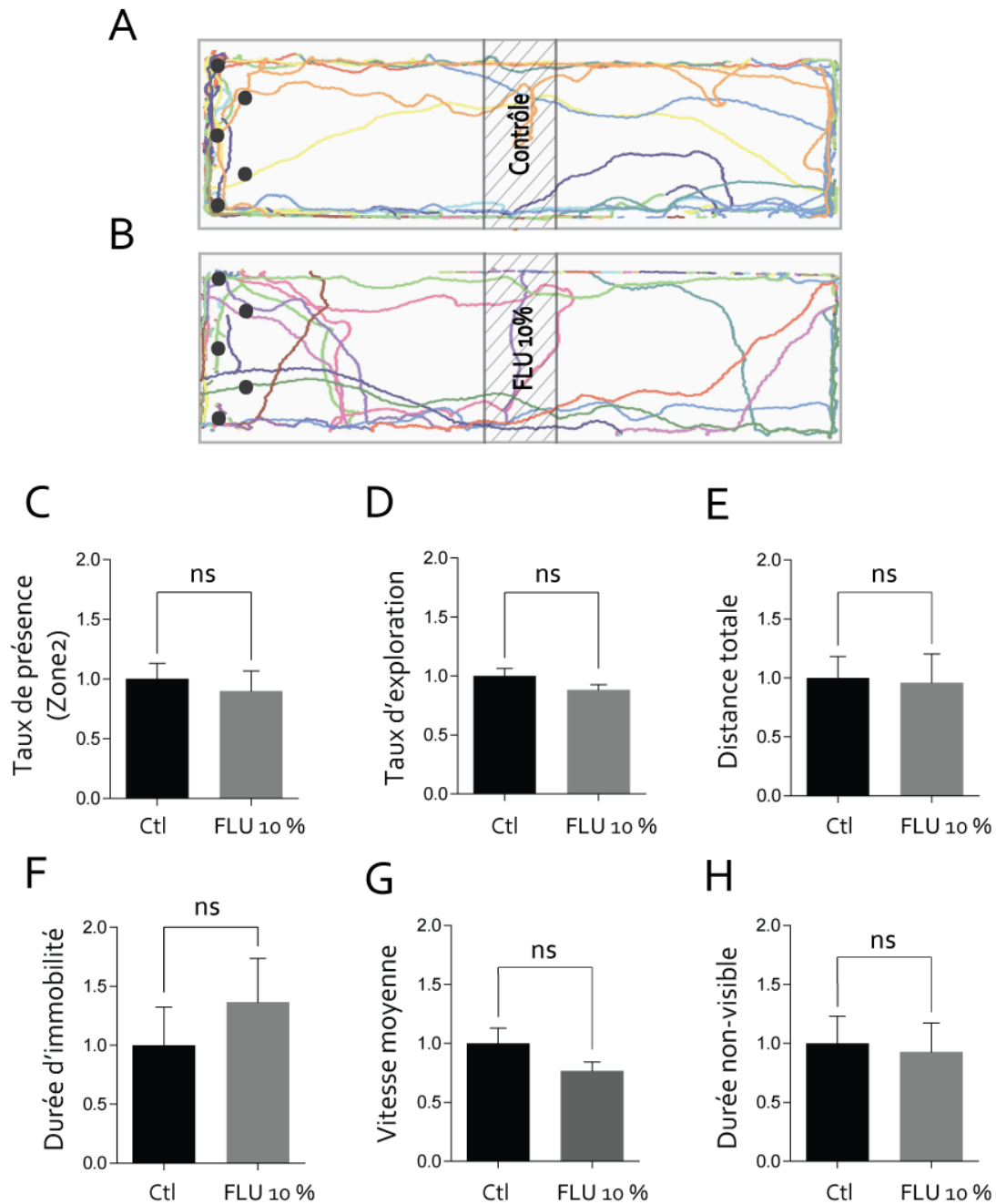


Figure 42 : Effet répulsif du flupyradifurone (FLU) quand il est appliqué à une concentration de 10% au centre de la plateforme.

Schéma représentant le tracé du mouvement des tiques lors des enregistrements pour le contrôle (A) et pour le test en présence du FLU 10% (B). (C, D, E, F, G et H) Histogrammes représentant la comparaison entre les groupes contrôles (Ctl) et test (FLU 10%). Les données ont été normalisées en fonction de la moyenne des groupes contrôles. 30 tiques ont été utilisées (6 groupes de 5 tiques). Les histogrammes représentent la moyenne \pm S.E.M, ns = non significatif et * = différence significative. Plusieurs paramètres obtenus par l'analyse du logiciel ToxTrac ont été utilisés comme le taux de présence dans la zone 2 (C), le taux d'exploration (D), la distance totale (E), la durée totale d'immobilité (F), la vitesse moyenne (G) et la durée totale où les tiques ont été non-visible (H).

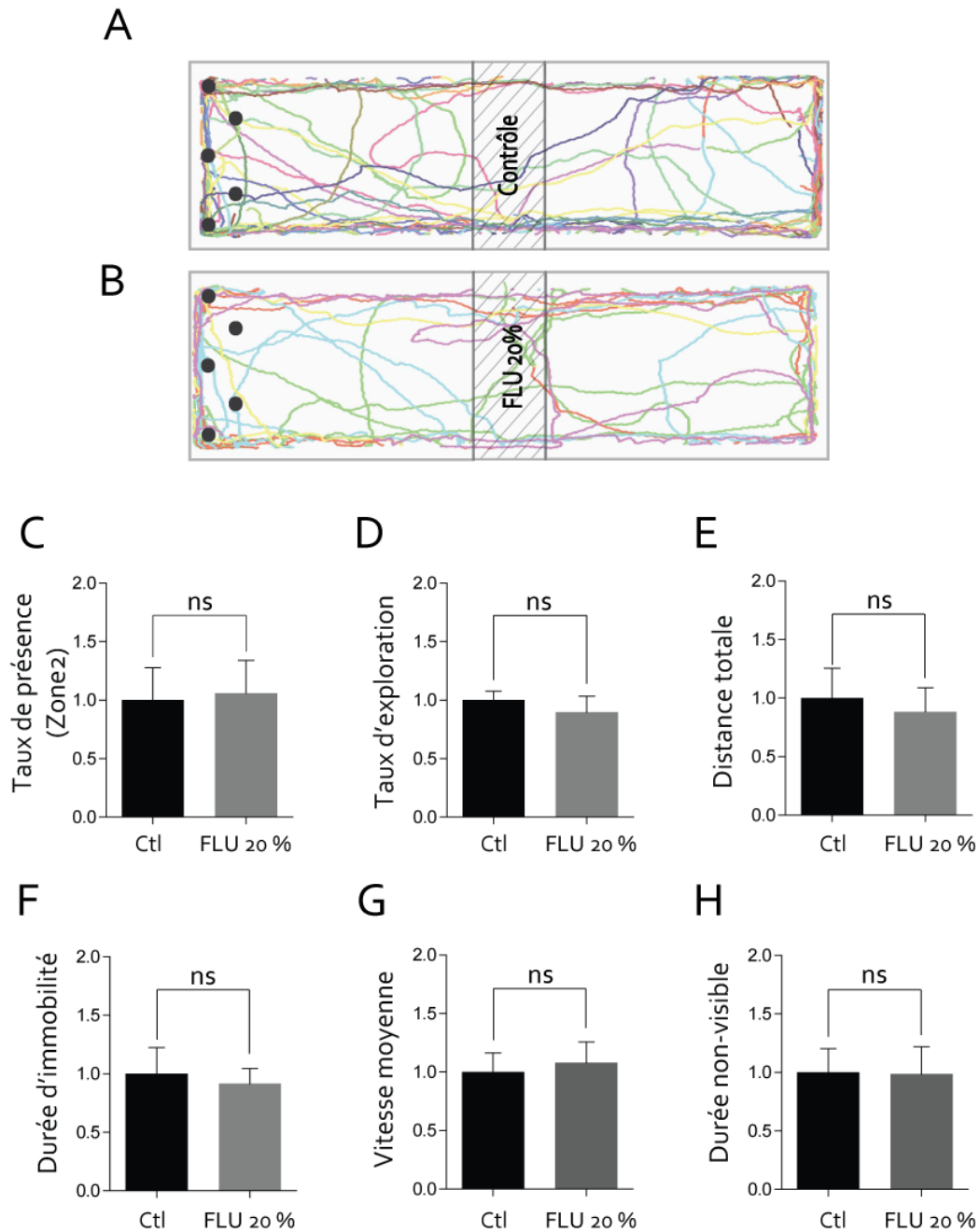


Figure 43 : Effet répulsif du flupyradifurone (FLU) quand il est appliqué à une concentration de 20% au centre de la plateforme.

Schémas représentant le tracé du mouvement des tiques lors des enregistrements pour le contrôle (A) et pour le test en présence du FLU 20% (B). Les histogrammes représentant la comparaison entre les groupes contrôles (Ctl) et test (FLU 20%). Les données ont été normalisées en fonction de la moyenne des groupes contrôles. 30 tiques ont été utilisées (6 groupes de 5 tiques). Les histogrammes représentent la moyenne \pm S.E.M, ns = non significatif et * = différence significative. Plusieurs paramètres obtenus par l'analyse du logiciel ToxTrac ont été utilisés comme le taux de présence dans la zone 2 (C), le taux d'exploration (D), la distance totale (E), la durée totale d'immobilité (F), la vitesse moyenne (G) et la durée totale où les tiques ont été non-visibles (H).

3 - Effet de la combinaison de DEET et de FLU sur les tiques

Des effets de synergie entre différentes classes de pesticides ont déjà été démontré chez plusieurs espèces d'insectes, comme sur le puceron du pois *A. pisum* (Taillebois et al. 2020), le moustique *A. aegyptii* (Ahmed and Matsumura 2012), et également chez des acariens comme la tique *R. sanguineus* (Prullage et al. 2011). L'utilisation de mélanges de molécules présentant des effets synergiques est un enjeu majeur pour permettre de diminuer les quantités de pesticides nécessaires à la lutte antivectorielle ou à la protection des cultures. L'emploi de concentrations plus faibles de pesticides permet de minimiser les effets néfastes sur les espèces non-ciblées par les traitements et de limiter le développement de mécanismes de résistance chez les espèces ciblées. Dans le cadre de notre étude, nous avons donc testé l'effet du mélange de DEET et de FLU à 10%.

Avec le mélange DEET+FLU 10%, un effet répulsif est observé dans un premier temps au niveau des trajectoires suivies par les tiques. En effet, la trajectoire des tiques dans la **Figure 44 B** montre que la présence de DEET+FLU 10% constitue une barrière, comparé à la trajectoire du groupe contrôle (**Figure 44 A**). Le manque d'exploration des tiques de la zone 2 est confirmé par le taux de présence des tiques qui diminue de 88% ($n = 30$, $*p < 0,05$, **Figure 44 C**). De ce fait, le taux d'exploration sur l'ensemble de la plateforme présente également une diminution significative de 30% en présence de DEET+FLU 10% (**Figure 44 D**, $n = 30$, $*p < 0,05$). Pour les paramètres décrivant le déplacement des tiques, on observe une diminution de 24% de la distance parcourue et de la vitesse moyenne des tiques (**Figure 44 E et G**, $n = 30$, $*p < 0,05$). Les deux derniers paramètres, le temps passé immobile ainsi que la durée totale où les tiques ont été non-visible ne montrent pas de différence significative (**Figure 44 F et H**, $n = 30$, $p > 0,05$).

Les résultats obtenus démontrent un effet répulsif du mélange DEET+FLU 10% avec une modification du comportement des tiques.

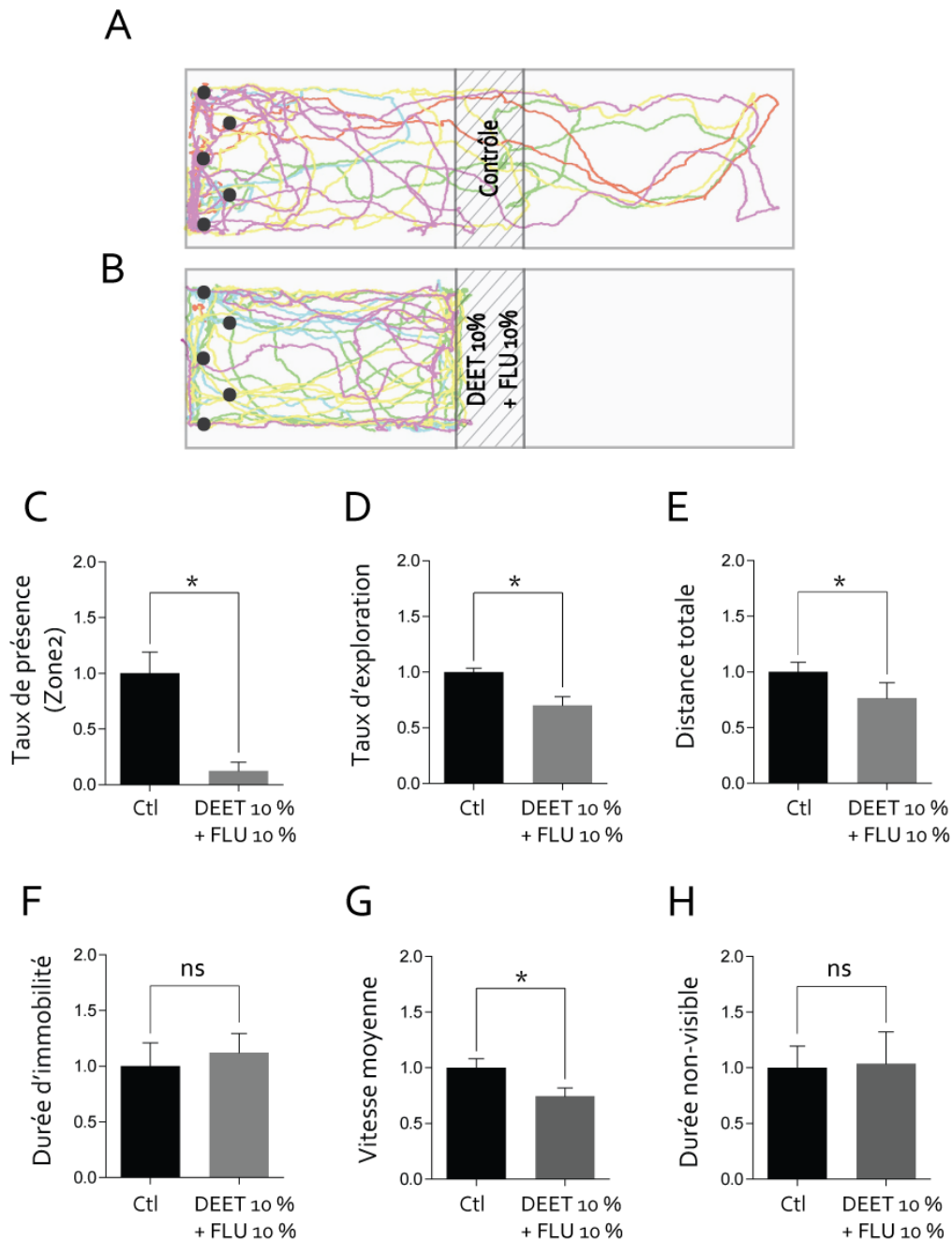


Figure 44 : Effet répulsif du mélange de DEET (10%) et de flupyradifurone (FLU, 10%) quand il est appliqué au centre de la plateforme.

Schémas représentant le tracé du mouvement des tiques lors des enregistrements pour le contrôle (A) et pour le test en présence du mélange DEET et FLU (10%) (B). Les histogrammes représentant la comparaison entre les groupes contrôles (Ctl) et test (DEET + FLU). Les données ont été normalisées en fonction de la moyenne des groupes contrôles. 30 tiques ont été utilisées (6 groupes de 5 tiques). Les histogrammes représentent la moyenne \pm S.E.M, ns = non significatif et * = différence significative. Plusieurs paramètres obtenus par l'analyse du logiciel ToxTrac ont été utilisés comme le taux de présence dans la zone 2 (C), le taux d'exploration (D), la distance totale (E), la durée totale d'immobilité (F), la vitesse moyenne (G) et la durée totale où les tiques ont été non-visibles (H).

4 - Conclusion sur les travaux concernant l'étude de l'effet du DEET et du FLU sur le comportement de la tique

4.1 - Effet répulsif du DEET, seul ou en combinaison avec le FLU

Ce test comportemental a été réalisé afin de tester l'effet répulsif du FLU appartenant aux buténolides. Malgré l'effet neurotoxique de ce composé observé lors des expériences de microtransplantation de nAChRs natifs, le comportement des tiques *I. ricinus*, sur une courte période d'exposition, ne montre pas de fortes modifications, comme celles qui ont été constatées avec l'utilisation de DEET 20%. Nous avons également constaté que l'utilisation de DEET 10% ne modifie pas le comportement d'exploration de la plateforme par les tiques. L'objectif de l'utilisation de combinaison de molécule est d'obtenir un effet de répulsion sur le comportement des tiques grâce à l'usage de la plus faible quantité de molécule. Le DEET 10% présente un effet répulsif important lorsqu'il est utilisé en mélange avec le FLU 10%, alors que pris indépendamment ils n'ont aucun effet sur le comportement de la tique. Ces résultats mettent donc en évidence un effet synergique du mélange DEET+FLU 10%. L'effet répulsif observé est supérieur à celui obtenu avec la solution de DEET20% qui sert de référence. Cette combinaison représente donc une alternative potentielle dans la lutte contre les tiques. Le FLU ne présentant aucun effet répulsif, quelle que soit la concentration testée, cela suggère qu'il agirait comme potentialisateur du DEET. Une étude récente portant sur l'effet répulsif de la combinaison entre la transfluthrine (pyréthrianoïde) et le DEET, sur des moustiques (*Aedes aegypti*), a montré que l'utilisation d'une faible concentration de transfluthrine (ne montrant pas d'effet répulsif à cette concentration) renforce significativement l'effet répulsive du DEET (Andreazza et al. 2021). Pour nos travaux réalisés sur la tique *I. ricinus*, l'utilisation du mélange de deux composés, le DEET et le FLU, a permis d'observer un effet répulsif significatif sur le comportement des parasites.

4.2 - Validation d'un dispositif original pour les tests de comportement chez la tique *Ixodes ricinus*

L'étude du comportement d'évitement des tiques permet de tester de nouveaux composés répulsifs *in-vivo* (Nchu, Magano, and Eloff 2016, 2012). Ces expériences sont régulièrement effectuées sur des nymphes ou des tiques adultes dans des dispositifs de petite taille, comme des boîtes de pétri (Carroll et al. 2004; Ferreira et al. 2017). Le dispositif mis au point dans ces travaux de thèse permet de combiner l'étude du comportement d'exploration et l'utilisation d'un dispositif de plus grande taille (plateforme). L'avantage majeur étant d'éviter une saturation en molécules odorantes du dispositif et de disposer d'un dispositif qui permet d'enregistrer et mesurer le déplacement des tiques.

Un autre type de dispositif est utilisé pour étudier le comportement d'ascension des tiques à l'aide d'une plateforme avec une tige en son centre permettant aux tiques de monter et d'être en contact avec des papiers filtres imbibés de substances à tester. Cette technique est utilisée chez les tiques adultes de plusieurs espèces comme *Rhipicephalus pulchessus* (Zorloni, Penzhorn, and Eloff 2010), *Hyalomma rufipes* (Nchu, Magano, and Eloff 2016, 2012), ou avec des larves comme dans le cas d'*I. ricinus* (Tabari et al. 2017). Nous avons également testé un tel dispositif et observé que le comportement des tiques femelles adultes *I. ricinus* ne permettait pas de réaliser une étude par rapport à leur comportement d'ascension. L'utilisation d'une plateforme horizontale a permis d'optimiser l'exploitation des données avec l'utilisation du logiciel Toxtrac. Plusieurs paramètres ont été sélectionnés dans l'analyse comportementale des tiques et ceux décrits dans les figures sont les plus démonstratifs des trajectoires, de l'immobilité, et de l'exploration, effectués par les tiques pendant les expériences. De plus, le paramètre mesurant le temps où les individus n'ont pas été visibles à la caméra permet de démontrer que ce phénomène n'est pas un biais car il ne montre pas de différence significative entre le groupe contrôle et en présence des composés (DEET, FLU seuls ou

Résultats et discussion : Etude in vivo du comportement d'évitement chez la tique *Ixodes ricinus*

en combinaison). Également, les expériences ont été répétées plusieurs fois et nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les groupes (Test T de Student, $p > 0,05$).

Les résultats obtenus pour la concentration à 20% de DEET ont montré un effet répulsif significatif, en accord avec des données disponibles dans la littérature (Katz, Miller, and Hebert 2008; Diaz 2016). Il serait intéressant de vérifier si le protocole peut être adapté pour d'autres espèces de tiques et d'autres stade de développement, ainsi que pour effectuer des tests dans le but de déterminer le potentiel attractif de certains composés comme des phéromones, d'autres substances chimiques ou bien extraites de plantes.

Chapitre 3 : Caractérisation moléculaire des sous-unités de nAChRs de la tique *Ixodes ricinus*

La présence de sous-unités appartenant à des protéines de type canaux ioniques au sein de synganglia de tique est énoncée dans des études d'analyse de génome chez *I. scapularis* (Gulia-Nuss et al. 2016) et de transcriptome chez *R. microplus* (Lees, Woods, and Bowman 2010). L'objectif de ce chapitre est la caractérisation de sous-unités de nAChRs présentes dans le synganglion de la tique *I. ricinus*. La caractérisation des nAChRs au niveau moléculaire a été fortement soutenue par le Dr. Claude Rispe (équipe BioEpar, INRAe Oniris, Nantes, France) qui nous a permis d'avoir accès à des séquences prédites des sous-unités de nAChRs de la tique *I. ricinus*, avant leur publication (travaux en cours de publication).

1 - Clonage de quatre sous-unités de nAChRs neuronaux de la tique *Ixodes ricinus*

Les expériences menées en biologie moléculaire ont permis de cloner la séquence complète de quatre sous-unités distinctes de nAChRs exprimées au niveau du synganglion de la tique *I. ricinus* (**Figure 45**).

L'analyse des séquences protéiques des sous-unités appartenant à la tique *I. ricinus* a montré la présence des domaines fonctionnels caractéristiques des sous-unités de nAChRs comprenant les 4 domaines transmembranaires (déterminés par l'utilisation du logiciel TMHMM2.0), (Möller, Croning, and Apweiler 2001), les 6 boucles A-F ainsi que les deux cystéines impliquées dans la « cys-loop » présentes dans la région N-terminale (**Figure 46**). Ces domaines fonctionnels caractéristiques permettent de valider que les séquences obtenues correspondent à des sous-unités de nAChRs

Résultats et discussion : Caractérisation moléculaire des sous-unités de nAChRs de la tique *Ixodes ricinus*

pouvant former des récepteurs fonctionnels. De plus, la présence du doublet de cystéines adjacentes au niveau de la boucle C indique que les 4 séquences correspondent à des sous-unités de type α .

Afin de suivre la nomenclature standard utilisée pour la dénomination des sous-unités d'insectes, le logiciel BioEdit (Hall 1999) a été utilisé pour déterminer la matrice d'identité entre les séquences codantes protéiques des sous-unités de la tique *I. ricinus* avec les dix sous-unités de références de *D. melanogaster* (Dmel α 1-7 et Dmel β 1-3, **Tableau 13**). Ainsi en prenant l'indice d'identité le plus élevé pour chaque sous-unité de la tique, la sous-unité Iric α 1 est la plus proche de la sous-unité Dmel α 1 (59,5% d'identité). De même pour la sous-unité Iric α 2 qui est la plus proche de la sous-unité Dmel α 2 (52,4% d'identité), et Iric α 6 qui possède 62,3% d'identité face à la séquence de Dmel α 6. Pour la dernière sous-unité décrite pendant ces travaux, on observe un taux d'identité de 31,5% entre les sous-unités Iric α 5 et Dmel α 5.

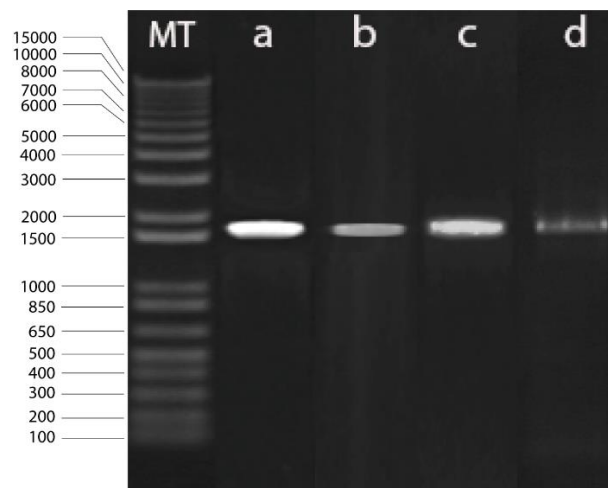


Figure 45 : Illustration des amplifications des ORFs entières obtenues par PCR pour les sous-unités Iric α 1, Iric α 2, Iric α 5 et Iric α 6 de la tique *Ixodes ricinus*.

Les bandes illustrées ici représentent l'amplification partielle de la sous-unité Iric α 1 (a), Iric α 2 (b), Iric α 6 (c) et α Iric5 (d) présentes entre 1500 et 1650 pb pour toutes les amplifications. Le marqueur de taille (MT) permet d'obtenir la taille des fragments allant de 100 à 15 000 pb.

Résultats et discussion : Caractérisation moléculaire des sous-unités de nAChRs de la tique *Ixodes ricinus*

Tableau 13 : Description d'une matrice d'identité de séquence entre les sous-unités de références appartenant à *D. melanogaster* et les séquences des sous-unités provenant du synganglion de la tique *I. ricinus*.

D α et D β signifient respectivement sous-unité de drosophile de type α et β (le numéro d'accension est indiqué à la suite). Les sous-unités appartenant à l'espèce *I. ricinus* sont appelées Iric α .

| | Iric α 1 | Iric α 2 | Iric α 6 | Iric α 5 |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Dmel α 1 (CAA30172) | 0.595 | 0.575 | 0.309 | 0.282 |
| Dmel α 2 (CAA36517) | 0.500 | 0.524 | 0.297 | 0.290 |
| Dmel α 3 (CAA75688) | 0.356 | 0.372 | 0.239 | 0.198 |
| Dmel α 4 (CAB77445) | 0.508 | 0.493 | 0.308 | 0.268 |
| Dmel α 5 (AAM13390) | 0.335 | 0.328 | 0.570 | 0.313 |
| Dmel α 6 (AAM13392) | 0.353 | 0.356 | 0.623 | 0.317 |
| Dmel α 7 (AAK67257) | 0.156 | 0.152 | 0.243 | 0.151 |
| Dmel β 1 (CAA27641) | 0.389 | 0.383 | 0.316 | 0.276 |
| Dmel β 2 (CAA39211) | 0.529 | 0.537 | 0.319 | 0.279 |
| Dmel β 3 (CAC48166) | 0.170 | 0.179 | 0.174 | 0.194 |

Les séquences Iric α 1 et Iric α 2 présentent une insertion de 9 et 8 acides aminés respectivement dans leur séquence protéique au niveau de la boucle F, comparé aux séquences des sous-unités Iric α 5 et Iric α 6 (**Figure 46**). D'après les études menées sur l'identification des sous-unités de nAChRs chez l'abeille (*A. mellifera*), cette insertion pourrait indiquer que la liaison de l'IMI est possible (Jones et al. 2006; Shimomura et al. 2004). De plus, le motif d'acides aminés « GEK » positionné en amont du TM2 est conservé pour les séquences Iric α 1, Iric α 2 et Iric α 5, alors que pour la sous-unité Iric α 6 ce motif est remplacé par « GER ». D'après l'étude de Shao (2007), la conservation du motif « GEK » est liée à la sélectivité cationique, en particulier grâce à la présence du résidu glutamate. La modification du motif dans la séquence Iric α 6 pourrait ne pas avoir d'effet sur cette sélectivité ionique (Shao, Dong, and Zhang 2007).

Résultats et discussion : Caractérisation moléculaire des sous-unités de nAChRs de la tique *Ixodes ricinus*

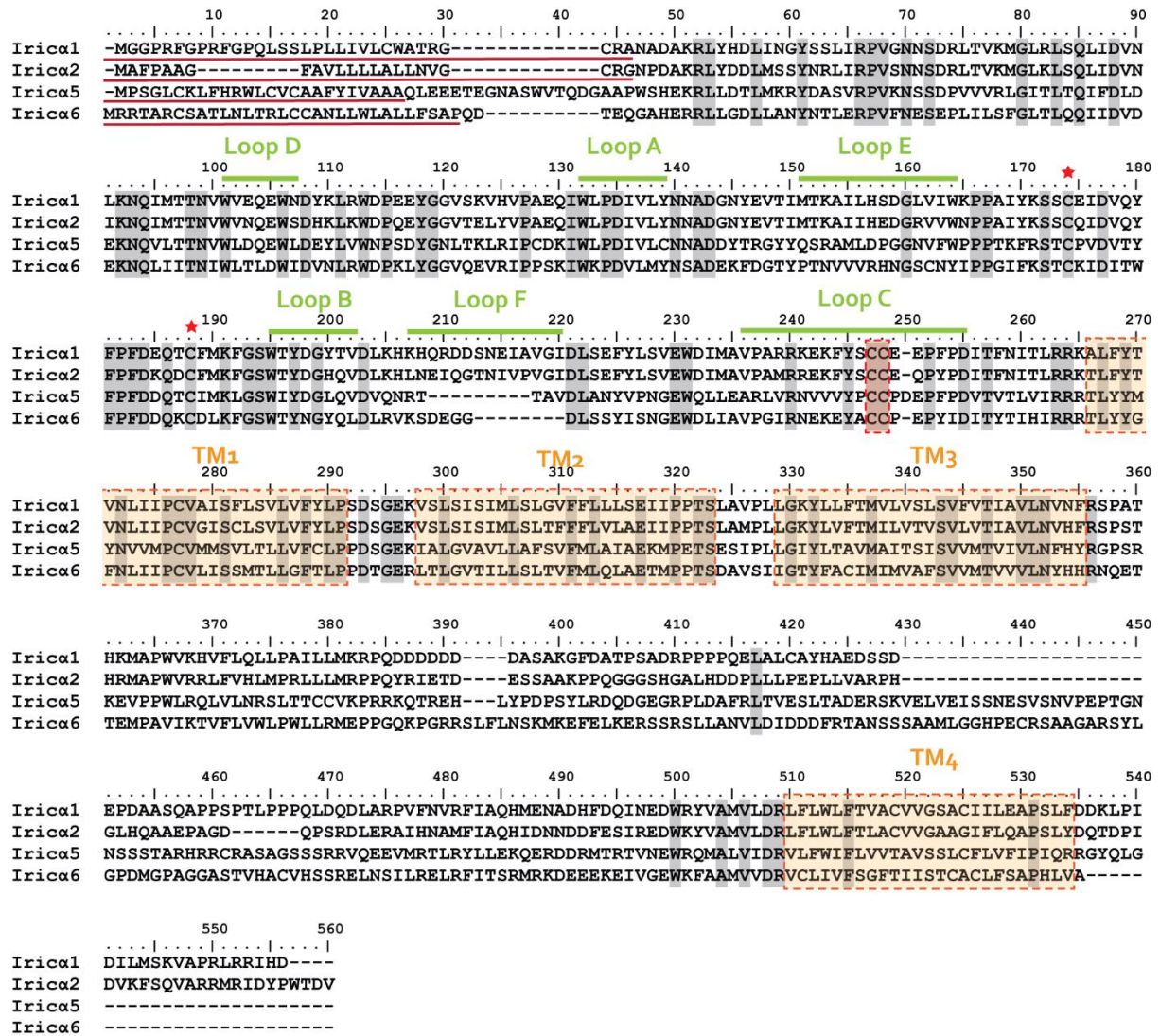


Figure 46 : Alignement des séquences protéiques des sous-unités de nAChRs de la tique *Ixodes ricinus* obtenues par clonage.

Les résidus sont surlignés en gris lorsque la similarité entre les différentes séquences est de 100%. Les séquences définies comme étant un signal peptidique sont représentées par un trait rouge, les boucles A-F (Loop A-F) sont indiquées par un trait vert, les domaines transmembranaires (TM1-4) par un cadre jaune, les cystéines adjacentes présentes dans la boucle C (caractéristiques des sous-unités α) sont indiquées par un cadre rouge et les cystéines séparées de 13 acides aminés impliquées dans la « cys-loop » sont représentées par une étoile rouge.

Résultats et discussion : Caractérisation moléculaire des sous-unités de nAChRs de la tique *Ixodes ricinus*

Afin d'aller plus loin dans l'analyse des séquences des sous-unités nAChR des tiques, nous avons décidé de les comparer avec des séquences d'espèces d'insectes, à l'intérieur desquelles des mutations de résidus ont été observées chez des organismes résistants aux pesticides (Figure 47). Chez les insectes résistants aux néonicotinoïdes de l'espèce *N. lugens*, la mutation Y151S, localisée dans les sous-unités Nluga1 et Nluga3, n'apparaît pas dans la séquence de la tique (Liu et al. 2006). De même, la mutation G275E, impliquée dans l'insensibilité au spinosad décrite chez *Frankliniella occidentalis*, n'est pas visible dans les séquences de sous-unités de la tique (Puinean et al. 2013). En revanche, la modification d'une sérine en alanine décrite dans la sous-unité Dmel1a1 des individus résistants à l'imidaclopride de l'espèce *D. melanogaster* est retrouvée dans la séquence de la sous-unité Irica6 (Shimada et al. 2020). Cela peut indiquer que les récepteurs formés avec cette sous-unité pourraient être moins sensibles aux néonicotinoïdes.

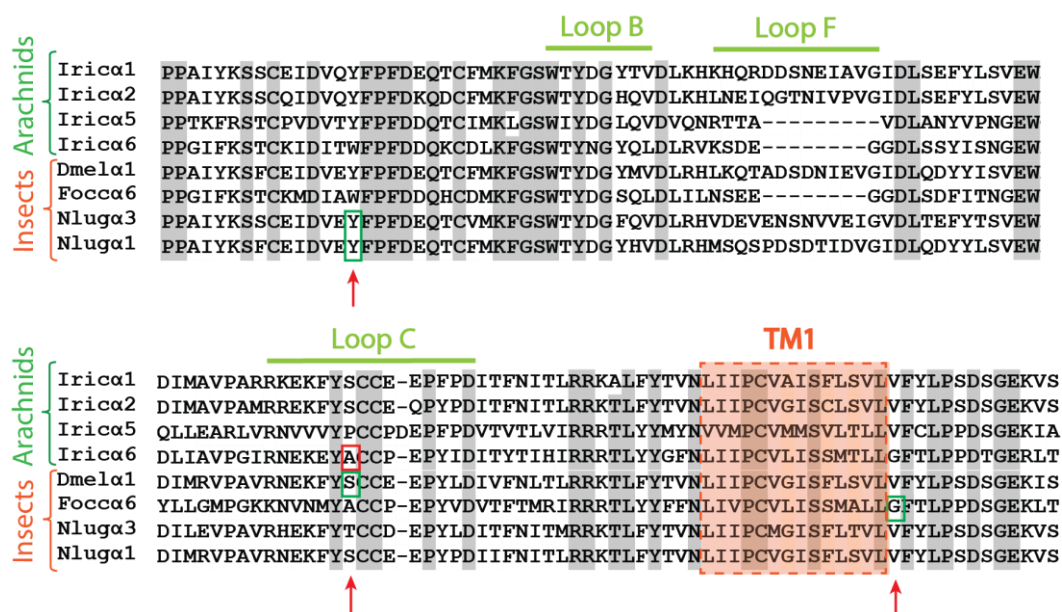


Figure 47 : Étude de la présence de mutations au sein des séquences de la tique *Ixodes ricinus* (Arachnids), décrites chez plusieurs espèces d'insectes (Insects).

Les séquences appartenant à la tique sont nommées Irica1, Irica2, Irica5, Irica6. Les séquences d'insectes appartiennent aux espèces *D. melanogaster* (Dmel1a1, CAA30172), *F. occidentalis* (Focca6, CCJ47293) et *N. lugens* (Nluga1, BBE49554 et Nluga3, BBE49556). L'alignement est focalisé sur une région commune des différentes séquences comprenant les mutations décrites chez les espèces d'insectes étudiées ici. Les résidus sont surlignés en gris lorsque la similarité entre les différentes séquences est de 100%. Les boucles B, C et F (Loop B, C, F) sont indiquées par un trait vert, le domaine transmembranaire (TM1) par un cadre jaune. Les sites de mutation sont représentés par une flèche rouge, les résidus encadrés en vert représentent les sites où des mutations ont été détectées dans les autres espèces d'arthropodes, le résidu encadré en rouge est le site où la mutation peut être présente dans la séquence de tique.

2 - Conclusion sur les sous-unités de nAChRs identifiés dans le synganglion de la tique *Ixodes ricinus*

L'identification de sous-unités de nAChRs chez la tique *I. ricinus* qui a été menée pour ces travaux de thèse, démontre la présence de plusieurs sous-unités de récepteurs nicotiques à l'intérieur du synganglion de la tique. Le génome de la tique *I. ricinus* n'étant pas actuellement séquencé et annoté, il n'est pas possible d'avoir une identification exhaustive des sous-unités de nAChRs. Malgré cela, l'obtention des séquences prédites provenant du transcriptome de cette même espèce a aidé à obtenir les séquences codantes de quatre sous-unités (Iric α 1, Iric α 2, Iric α 5 et Iric α 6). D'après l'étude de Meng *et al.*, (2015), l'alignement de la sous-unité α 2 de l'espèce *P. pseudoannulata* avec les sous-unités α 2 de plusieurs espèces d'insectes (*D. melanogaster*, *B. mori*, *T. castaneum*, *A. gambiae*, *A. mellifera*) a montré plusieurs différences au sein des boucles A, B et C (Meng *et al.* 2015b). Dans la séquence protéique Iric α 2, nous pouvons constater que de façon similaire à *P. pseudoannulata*, une glutamine remplace l'histidine décrite chez *D. melanogaster* (H30Q, **Figure 46**). Il faut également noter que des amplifications partielles ont été obtenues pour les sous-unités α 4, β 1 et β 2, ce qui nous encourage à continuer la caractérisation moléculaire de ces autres sous-unités chez *I. ricinus*. Nous avons entrepris la comparaison des séquences de la tique avec celles d'insectes présentant une sensibilité ou une résistance pour des pesticides, pour lesquelles des résidus clés pour la liaison des pesticides ont été identifiés (**Figure 47**). La présence ou non de ces résidus clés dans les séquences de la tique pourrait donner une idée *a priori* sur la sensibilité potentielle des nAChRs d'*I. ricinus* pour ces molécules. Des études plus poussées seront nécessaires pour connaître la réelle sensibilité des nAChRs de la tique, telle que la modélisation de récepteurs à partir des sous-unités décrites chez *I. ricinus*, permettant d'obtenir des informations sur de potentiels sites de liaison présents à l'interface entre 2 sous-unités distinctes.

Conclusions et perspectives

1 - Caractérisation pharmacologique des nAChRs natifs de la tique *Ixodes ricinus*

Des recherches dans le but de développer de nouvelles molécules acaricides ou répulsives ayant des cibles originales au sein du système nerveux des tiques commencent à être réalisées (Selzer 2018). Par exemple, la caractérisation phylogénomique de canaux potassiques à rectification entrante comme potentielle cible d'acaricides est une piste récemment étudiée (Saelao et al. 2021). Également, l'étude des nAChRs chez les tiques n'est encore qu'à son début mais les travaux effectués sur la caractérisation de leurs génomes vont permettre d'accélérer l'identification et la compréhension de ces récepteurs dans le but de développer des acaricides plus spécifiques des tiques (Gulia-Nuss et al. 2016; Dermauw et al. 2012; Grbić et al. 2011; Meng et al. 2015a), Rispe *et al.*, travaux en cours de publication).

Dans le cadre de ma thèse, j'ai pu démontrer que la technique de microtransplantation d'extraits membranaires de tissus nerveux d'arthropodes est une approche prometteuse pour décrire l'implication de récepteurs membranaires dans des fonctions physiologiques ou encore dans le but de tester des molécules neurotoxiques dans le cadre de la lutte contre les espèces nuisibles. De plus, l'intérêt d'injecter des préparations membranaires permet de conserver le contexte lipidique natif du récepteur (Eusebi et al. 2009). Les lipides membranaires sont décrits comme des modulateurs des nAChRs au niveau de leur modification de conformation ainsi que leurs cinétiques d'ouverture et de fermeture du canal (Baenziger et al. 2015). Ainsi la microtransplantation de récepteurs natifs comprenant également leurs modulateurs naturels permet d'étudier les nAChRs dans un contexte se rapprochant des réponses électrophysiologiques qui pourraient être obtenues *in-vivo*.

Suite à l'obtention du protocole nous permettant d'étudier la pharmacologie des nAChRs natifs de la tique *I. ricinus*, nous avons pu déterminer la présence de récepteurs sensibles à l' α -Bgt au sein des extraits membranaires du synganglion, ainsi que leur sensibilité à l'ACh, la Nic, aux néonicotinoïdes (IMI, ACE, TMX et CLT), au DEET et au FLU. Suite à cette caractérisation, un vaste

Conclusions et perspectives

criblage de nouvelles substances (chimiques ou extraites de plantes) est envisageable dans le but de tester l'efficacité de nouvelles molécules acaricides ciblant les nAChRs.

2 - Etude du comportement d'évitement chez la tique *Ixodes ricinus*

L'étude du comportement d'évitement des tiques a permis de tester l'effet du DEET et du FLU sur les femelles adultes *I. ricinus*. L'utilisation du FLU a montré que, malgré son activité agoniste au niveau des nAChRs de la tique *I. ricinus*, il ne provoque pas de comportement d'évitement lorsque les tiques sont en présence de cette substance. Afin de compléter ces données, des études de toxicité sur les organismes est envisageable et serait intéressantes à mener afin de constater le pouvoir acaricide du FLU sur l'espèce *I. ricinus*. Cela n'a pas été mis en place au cours de ces travaux de thèse car dans un but appliqué, ce sont plutôt des molécules répulsives qui sont utilisées pour la protection des Hommes.

Les expériences comportementales pourront être complétées par l'étude de nouveaux composés dans le but d'observer leur potentiel répulsif ou attractif sur les tiques (nouvelles molécules synthétisées au laboratoire et non commercialisées, ou composés provenant d'extraits de plantes). De plus, les synganglia des tiques exposées pendant l'expérience comportementale ayant été conservés, des études moléculaires peuvent être envisagée dans le but de visualiser un effet de modulation sur l'expression des nAChRs présent dans le synganglion de la tique. Ce type d'étude a déjà été appliqué à plusieurs espèces d'arthropodes telles que la mouche *M. domestica* dans le but de déterminer la localisation de l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ (Markussen and Kristensen 2010), chez le puceron *A. pisum* suite à des expositions à l'IMI, au TMX et à la CLT (Taillebois et al. 2014), ou encore chez *Bradysia odoriphaga* après une exposition à l'IMI (Shan et al. 2020). Ces données seraient alors mises en relation avec les expériences menées en électrophysiologie sur des ovocytes

Conclusions et perspectives

microtransplantés avec des préparations de membranes provenant du synganglion ou bien sur des ovocytes exprimant des récepteurs composés de sous-unités de la tique *I. ricinus*. En effet, les approches *in-vitro* et *in-vivo* sont complémentaires et la corrélation entre ces approches permettra de réaliser un criblage de molécules acaricides et/ou répulsives efficaces et à moindre coût.

3 - Identification moléculaire des sous-unités de nAChRs chez la tique *I. ricinus*

Un enjeu majeur dans l'étude des nAChRs de la tique *I. ricinus* est l'identification au niveau moléculaire des différentes sous-unités présentes dans le synganglion. Suite à cette caractérisation des études concernant l'implication des différentes sous-unités dans les propriétés pharmacologiques des nAChRs exprimés en ovocytes de xénope seront réalisées. Afin de répondre à cet objectif, des approches de biologie moléculaire ont été mises en place et ont déjà permis l'identification de quatre sous-unités de nAChRs chez la tique *I. ricinus*, telles que Iric α 1, Iric α 2, Iric α 5 et Iric α 6. L'obtention de ces séquences codantes n'est que le début des travaux à réaliser dans la caractérisation complète de ces nAChRs de la tique. Plusieurs étapes sont ensuite envisageables, comme la modélisation des récepteurs pouvant être formés avec ces sous-unités (en combinaison avec d'autres sous-unités pour les récepteurs hétéromériques), dans le but de visualiser les sites de liaisons théoriques. Cette modélisation a été réalisée lors de l'étude sur la sensibilité de sous-unités appartenant à plusieurs espèces de tiques (Erdmanis et al. 2012). Dans cette étude, la modélisation d'un nAChR comprenant la structure de l'AChBP (*A. californica*) combinée avec les séquences d'une sous-unité α et β de la tique *I. scapularis* a montré qu'une mutation au niveau de la boucle D (R81Q) pourrait empêcher la liaison de l'IMI (Erdmanis et al. 2012). L'obtention de sous-unités de type β permettra de comparer les séquences protéiques avec celles d'espèces connues possédant des mutations au niveau des résidus important dans la liaison aux agonistes et notamment aux néonicotinoïdes, les rendant moins sensibles à ces pesticides. Des mutations créant des résistances chez des insectes ont déjà été décrites

Conclusions et perspectives

comme R81T présent chez certaines populations de *M. persicae* ou chez *A. gossypii* (Bass et al. 2011; Hirata et al. 2015). Cette mutation est également présente chez *P. pseudoannulata* (R81Q), ainsi que N137G et F190W présentent respectivement dans les boucles D, E et F (Song et al. 2009).

Récemment, des sous-unités appartenant aux AChBP d'une araignée (*Pardosa pseudoannulata*, Pp-AChBP) ont été décrites, dans le but de servir de modèle pour étudier et modéliser les interactions entre les nAChRs d'arthropodes et de nouvelles molécules pesticides. L'utilisation de la Pp-AChBP pourrait apporter des informations supplémentaires aux études de liaison par affinité en remplaçant l'ancienne protéine modèle provenant de *L. stagnalis*, qui pouvait montrer une sensibilité aux pesticides différentes de celle observée chez les arthropodes (Bao, Meng, and Liu 2017). En effet la Pp-AChBP est plus sensible aux molécules ayant un effet sur les nAChRs d'arthropodes, tels que les néonicotinoïdes, et pourrait être une bonne alternative pour modéliser l'effet que peuvent avoir les pesticides au niveau des sites de liaison de la Pp-AChBP (Bao, Meng, and Liu 2017). Ainsi, il serait intéressant de se baser sur la structure de la Pp-AChBP pour modéliser la liaison de différentes molécules agonistes, qui pourrait être de potentiels acaricides, à partir des séquences protéiques des sous-unités de nAChRs de la tique *I. ricinus*.

4 - Perspectives d'études de l'expression des sous-unités des nAChRs d'*Ixodes ricinus* en ovocyte de xénope.

L'expression des sous-unités précédemment clonées de la tique *I. ricinus* pourra être effectuée afin de réaliser l'étude électrophysiologique en ovocyte de xénope de récepteurs nicotiniques fonctionnels appartenant à la tique. Cette étude, mise en relation avec les données obtenues par la microtransplantation de membranes du synganglion, permettra de définir quel type de nAChRs de la tique sont impliqués dans la pharmacologie des récepteurs natifs précédemment obtenue.

Conclusions et perspectives

L'étude de récepteurs composés d'une sous-unité de tique a été notamment réalisée dans les travaux menés par Lees *et al.*, (2014) pour la sous-unité α_1 de la tique *R. sanguineus*. Leur étude a permis de montrer que le récepteur $R_{\text{san}}\alpha_1/\beta_2$ de poulet est sensible à l'ACh (EC_{50} d'environ 10 μM), mais que l'IMI (100 μM) et le spinosad (100 μM) n'induisent pas de réponses (Lees et al. 2014). De plus, si l'identification moléculaire des sous-unités de la tique *I. ricinus* permet d'obtenir des sous-unités de type β , leur utilisation en remplacement de la sous-unité β de vertébré (ici la β_2 du rat ou $R\beta_2$) pourrait aider à la formation de récepteurs fonctionnels en ovocyte de xénope. Pour aller plus loin, l'étude des autres sous-unités identifiées chez la tique *I. ricinus* en coexpression avec $Iric\alpha_1$ en système hétérologue est également envisageable. Par exemple, l'étude de nAChRs provenant de l'espèce *N. lugens* a été réalisée en injectant 2 sous-unités α de l'insecte ($Nlug\alpha_3$ et $Nlug\alpha_8$) coexprimée avec la $R\beta_2$. Cette coexpression a permis d'obtenir une EC_{50} pour l'ACh 5,5 fois inférieure pour les récepteurs $Nlug\alpha_3/Nlug\alpha_8/R\beta_2$ ($EC_{50} = 17,4 \pm 11,7 \mu\text{M}$), comparé à l'expression des récepteurs $Nlug\alpha_8/\beta_2$ ($EC_{50} = 95,8 \pm 3,7 \mu\text{M}$), (Yixi et al. 2009). Dans cette même idée, l'étude de récepteurs de la tique *I. ricinus* peuvent être menées en effectuant des combinaisons avec les autres sous-unités identifiées au laboratoire ($Iric\alpha_2$, $Iric\alpha_5$, $Iric\alpha_6$). Cela permettrait de faire un criblage plus complet des combinaisons de sous-unités possibles qui donneraient des récepteurs fonctionnels en ovocyte de xénope.

De plus, des expériences de mutagenèse seront intéressantes à mener dans le but d'obtenir des informations sur l'origine de l'insensibilité potentielle des récepteurs nicotiniques de la tique *I. ricinus*, insensibilité déjà décrite pour d'autres espèces d'arachnides pour certains pesticides comme les néonicotinoïdes (Lees et al. 2014; Erdmanis et al. 2012; Song et al. 2009; Dermauw et al. 2012). Dans l'étude de Song *et al.*, (2009). La modification de régions présentes dans la séquence de la sous-unité β_1 de *M. persicae* et de *P. pseudoannulata* ont révélé l'implication des boucles D, E et F dans l'insensibilité à l'IMI de la sous-unité β_1 de l'araignée (Song et al. 2009). La réalisation de ce type d'expériences pourra nous permettre d'observer chez l'espèce *I. ricinus* l'implication de certaines mutations dans cette insensibilité. Ainsi une réflexion sur les stratégies dans le but de contrer cette insensibilité sera envisageable, notamment par l'utilisation de molécules ciblant les nAChRs mais

Conclusions et perspectives

dont la structure est différente des néonicotinoïdes comme les spinosynes ou encore les buténolides comme le flupyradifurone.

5 - Conclusion générale

De manière globale, les approches actuellement utilisées pour lutter contre les tiques montrent qu'il reste encore beaucoup d'informations à obtenir au niveau de la recherche. Dans un futur proche, l'enjeu sera de développer des techniques de lutte intégrée qui seront basées sur la biologie de la tique ainsi que son écologie. Cette lutte intégrée pourra associer plusieurs techniques telles que les approches médicales (santé humaine / vétérinaire) et les approches de protection personnelles (protection avec des acaricides, des substances répulsives, des huiles essentielles). Pour faire face à l'augmentation de la présence des tiques dans notre environnement, des moyens de contrôle efficaces et sûrs sont nécessaires pour protéger les différents types de populations exposées aux pathogènes transmis par ces parasites (population humaine, animaux d'élevage ou de compagnie). Les moyens de lutte préventifs sont les plus faciles à mettre en place actuellement, à base de répulsifs et d'acaricides ciblés sur les tiques et en particulier sur les espèces connues comme vectrices de pathogènes transmettant des zoonoses, telle que la tique *I. ricinus*. Le développement des protocoles utilisés lors de ces travaux de thèse sont directement liés à cette problématique globale, car leur application a pour but de déterminer l'efficacité de nouveaux composés répulsifs et/ou acaricides efficaces sur la tique *I. ricinus*, grâce à un criblage de composés par plusieurs approches peu coûteuses et faciles à mettre en place.

Références

Références

- Abbas, R. Z., M. A. Zaman, D. D. Colwell, J. Gilleard, and Z. Iqbal. 2014. 'Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play', *Vet Parasitol*, 203: 6-20.
- Abd-Ella, A., M. Stankiewicz, K. Mikulska, W. Nowak, C. Pennetier, M. Goulu, C. Fruchart-Gaillard, P. Licznar, V. Apaire-Marchais, O. List, V. Corbel, D. Servent, and B. Lapied. 2015. 'The Repellent DEET Potentiates Carbamate Effects via Insect Muscarinic Receptor Interactions: An Alternative Strategy to Control Insect Vector-Borne Diseases', *PLoS One*, 10: e0126406.
- Abdel-Ghaffar, Fathy, Saleh Al-Quraishy, and Heinz Mehlhorn. 2015. 'Length of tick repellency depends on formulation of the repellent compound (icaridin = Saltidin®): tests on *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ricinus* placed on hands and clothes', *Parasitology Research*, 114: 3041-45.
- Adams, Mark D., Susan E. Celniker, Robert A. Holt, Cheryl A. Evans, Jeannine D. Gocayne, Peter G. Amanatides, Steven E. Scherer, Peter W. Li, Roger A. Hoskins, Richard F. Galle, Reed A. George, Suzanna E. Lewis, Stephen Richards, Michael Ashburner, Scott N. Henderson, Granger G. Sutton, Jennifer R. Wortman, Mark D. Yandell, Qing Zhang, Lin X. Chen, Rhonda C. Brandon, Yu-Hui C. Rogers, Robert G. Blazej, Mark Champe, Barret D. Pfeiffer, Kenneth H. Wan, Clare Doyle, Evan G. Baxter, Gregg Helt, Catherine R. Nelson, George L. Gabor, Miklos, Josep F. Abril, Anna Agbayani, Hui-Jin An, Cynthia Andrews-Pfannkoch, Danita Baldwin, Richard M. Ballew, Anand Basu, James Baxendale, Leyla Bayraktaroglu, Ellen M. Beasley, Karen Y. Beeson, P. V. Benos, Benjamin P. Berman, Deepali Bhandari, Slava Bolshakov, Dana Borkova, Michael R. Botchan, John Bouck, Peter Brokstein, Phillipe Brottier, Kenneth C. Burtis, Dana A. Busam, Heather Butler, Edouard Cadieu, Angela Center, Ishwar Chandra, J. Michael Cherry, Simon Cawley, Carl Dahlke, Lionel B. Davenport, Peter Davies, Beatriz de Pablos, Arthur Delcher, Zuoming Deng, Anne Deslattes Mays, Ian Dew, Suzanne M. Dietz, Kristina Dodson, Lisa E. Doup, Michael Downes, Shannon Dugan-Rocha, Boris C. Dunkov, Patrick Dunn, Kenneth J. Durbin, Carlos C. Evangelista, Concepcion Ferraz, Steven Ferriera, Wolfgang Fleischmann, Carl Fosler, Andrei E. Gabrielian, Neha S. Garg, William M. Gelbart, Ken Glasser, Anna Glodek, Fangcheng Gong, J. Harley Gorrell, Zhiping Gu, Ping Guan, Michael Harris, Nomi L. Harris, Damon Harvey, Thomas J. Heiman, Judith R. Hernandez, Jarrett Houck, Damon Hostin, Kathryn A. Houston, Timothy J. Howland, Ming-Hui Wei, Chinyere Ibegwam, Mena Jalali, Francis Kalush, Gary H. Karpen, Zhaoxi Ke, James A. Kennison, Karen A. Ketchum, Bruce E. Kimmel, Chinnappa D. Kodira, Cheryl Kraft, Saul Kravitz, David Kulp, Zhongwu Lai, Paul Lasko, Yiding Lei, Alexander A. Levitsky, Jiayin Li, Zhenya Li, Yong Liang, Xiaoying Lin, Xiangjun Liu, Bettina Mattei, Tina C. McIntosh, Michael P. McLeod, Duncan McPherson, Gennady Merkulov, Natalia V. Milshina, Clark Mobarry, Joe Morris, Ali Moshrefi, Stephen M. Mount, Mee Moy, Brian Murphy, Lee Murphy, Donna M. Muzny, David L. Nelson, David R. Nelson, Keith A. Nelson, Katherine Nixon, Deborah R. Nusskern, Joanne M. Pacleb, Michael Palazzolo, Gjange S. Pittman, Sue Pan, John Pollard, Vinita Puri, Martin G. Reese, Knut Reinert, Karin Remington, Robert D. C. Saunders, Frederick Scheeler, Hua Shen, Bixiang Christopher Shue, Inga Sidén-Kiamos, Michael Simpson, Marian P. Skupski, Tom Smith, Eugene Spier, Allan C. Spradling, Mark Stapleton, Renee Strong, Eric Sun, Robert Svirskas, Cyndee Tector, Russell Turner, Eli Venter, Aihui H. Wang, Xin Wang, Zhen-Yuan Wang, David A. Wassarman, George M. Weinstock, Jean Weissenbach, Sherita M. Williams, Trevor Woodage, Kim C. Worley, David Wu, Song Yang, Q. Alison Yao, Jane Ye, Ru-Fang Yeh, Jayshree S. Zaveri, Ming Zhan, Guangren Zhang, Qi Zhao, Liansheng Zheng, Xiangqun H. Zheng, Fei N. Zhong, Wenyan Zhong, Xiaojun Zhou, Shiaoqing Zhu, Xiaohong Zhu, Hamilton O. Smith, Richard A. Gibbs, Eugene W. Myers, Gerald M. Rubin, and J. Craig Venter. 2000. 'The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*', *Science*, 287: 2185-95.
- Agwunobi, Desmond O, Zhijun Yu, and Jingze Liu. 2021. 'A retrospective review on ixodid tick resistance against synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation', *Pesticide Biochemistry and Physiology*: 104776.
- Ahmad, Munir, Mushtaq Ahmed Saleem, and Ali H Sayyed. 2009. 'Efficacy of insecticide mixtures against pyrethroid-and organophosphate-resistant populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)', *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65: 266-74.

Références

- Ahmed, M.A.I., and F. Matsumura. 2012. 'Synergistic Actions of Formamidine Insecticides on the Activity of Pyrethroids and Neonicotinoids Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)', *Journal of Medical Entomology*, 49: 1405-10.
- Albuquerque, Edson X., Edna F. R. Pereira, Manickavasagom Alkondon, and Scott W. Rogers. 2009. 'Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function', *Physiological Reviews*, 89: 73-120.
- Alkondon, Manickavasagom, and Edson X. Albuquerque. 2004. 'The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex.' in, *Progress in Brain Research* (Elsevier).
- Anderson, J. F., and L. A. Magnarelli. 2008. 'Biology of ticks', *Infect Dis Clin North Am*, 22: 195-215, v.
- Andreazza, Felipe, Wilson Valbon, Qiang Wang, Feng Liu, Peng Xu, E. Bandason, Mengli Chen, Shaoying Wu, Leticia Smith, Jeffrey Scott, Youfa Jiang, Dingxin Jiang, Aijun Zhang, Eugenio Oliveira, and Ke Dong. 2021. 'Sodium channel activation underlies transluthrin repellency in *Aedes aegypti*', *PLoS neglected tropical diseases*, 15: e0009546.
- ANSES. 2021. 'Les néonicotinoïdes'.
- Arafa, Waleed M., Shawky M. Aboelhadid, Abeer Moawad, Khalid M. Shokeir, Osama Ahmed, and Adalberto A. Pérez de León. 2021. 'Control of *Rhipicephalus annulatus* resistant to deltamethrin by spraying infested cattle with synergistic eucalyptus essential oil-thymol-deltamethrin combination', *Veterinary Parasitology*, 290: 109346.
- Arias, Hugo R. 1997. 'Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor', *Brain Research Reviews*, 25: 133-91.
- Arias, Hugo R., Pankaj Bhumireddy, and Cecilia Bouzat. 2006. 'Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38: 1254-76.
- Ashoor, Abrar, Jacob C Nordman, Daniel Veltri, Keun-Hang Susan Yang, Lina Al Kury, Yaroslav Shuba, Mohamed Mahgoub, Frank C Howarth, Bassem Sadek, and Amarda Shehu. 2013. 'Menthol binding and inhibition of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors', *PLoS One*, 8: e67674.
- Babcock, Jonathan M, Clifford B Gerwick, Jim X Huang, Michael R Loso, Genta Nakamura, Steven P Nolting, Richard B Rogers, Thomas C Sparks, James Thomas, Gerald B Watson, and Yuanming Zhu. 2011. 'Biological characterization of sulfoxaflor, a novel insecticide', *Pest Management Science*, 67: 328-34.
- Badawi, Alaa, Maria Shering, Shusmita Rahman, and L. Robbin Lindsay. 2017. 'A systematic review and meta-analysis for the adverse effects, immunogenicity and efficacy of Lyme disease vaccines: Guiding novel vaccine development', *Canadian journal of public health = Revue canadienne de sante publique*, 108: e62-e70.
- Baenziger, John E., Camille M. Hénault, J. P. Daniel Therien, and Jiayin Sun. 2015. 'Nicotinic acetylcholine receptor–lipid interactions: Mechanistic insight and biological function', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848: 1806-17.
- Balashov, Yu S. 1972. 'Bloodsucking ticks (Ixodidae)-Vectors of diseases of man and animals', *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.*, 8: 161-376.
- Bao, H., X. Meng, and Z. Liu. 2017. 'Spider acetylcholine binding proteins: An alternative model to study the interaction between insect nAChRs and neonicotinoids', *Insect Biochem Mol Biol*, 90: 82-89.
- Barbara, G. S., B. Grunewald, S. Paute, M. Gauthier, and V. Raymond-Delpech. 2008. 'Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains', *Invert Neurosci*, 8: 19-29.

Références

- Barbour, A. G., and J. L. Benach. 2019. 'Discovery of the Lyme Disease Agent', *MBio*, 10.
- Barker, S. C., and A. Murrell. 2004. 'Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names', *Parasitology*, 129: S15-S36.
- Barnard, Eric Albert, Ricardo Miledi, and K Sumikawa. 1982. 'Translation of exogenous messenger RNA coding for nicotinic acetylcholine receptors produces functional receptors in *Xenopus* oocytes', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 215: 241-46.
- Bass, Chris, Ian Denholm, Martin S Williamson, and Ralf Nauen. 2015. 'The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121: 78-87.
- Bass, Chris, Alin M. Puinean, Melanie Andrews, Penny Cutler, Miriam Daniels, Jan Elias, Verity Laura Paul, Andrew J. Crossthwaite, Ian Denholm, Linda M. Field, Stephen P. Foster, Rob Lind, Martin S. Williamson, and Russell Slater. 2011. 'Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*', *BMC Neuroscience*, 12: 51.
- Beaufays, Jérôme, Benoît Adam, Catherine Menten-Dedoyart, Laurence Fievez, Amélie Grosjean, Yves Decrem, Pierre-Paul Prévôt, Sébastien Santini, Robert Brasseur, and Michel Brossard. 2008. 'Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB₄-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function', *PLoS One*, 3: e3987.
- Bedford, G. A. H. 1931. 'Nuttalliella namaqua, a New Genus and Species of Tick', *Parasitology*, 23: 230-32.
- Beniston, M, F Keller, RSJ Tol, R Delécolle, G Hoermann, A Iglesias, J Innes, AJ McMichael, WJM Martens, and I Nemesova. 1998. "The regional Impacts of Climate Change: Europe. In" The regional Impacts of Climate Change: An Assessment of Vulnerability. Intergovernmental Panel on Climate Change Working Group II"(Watson RT, Zinyowera MC, and Moss RH, Eds.)" In.: Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Bertrand, Daniel, and Murali Gopalakrishnan. 2007. 'Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors', *Biochemical Pharmacology*, 74: 1155-63.
- Binnington, KC, and DH Kemp. 1980. 'Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission', *Advances in Parasitology*, 18: 315-39.
- Bissinger, Brooke W, and R Michael Roe. 2010. 'Tick repellents: past, present, and future', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96: 63-79.
- Bodereau-Dubois, Béatrice, Olivier List, Delphine Calas-List, Olivier Marques, Pierre-Yves Communal, Steeve H. Thany, and Bruno Lapied. 2012. 'Transmembrane Potential Polarization, Calcium Influx, and Receptor Conformational State Modulate the Sensitivity of the Imidacloprid-Insensitive Neuronal Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor to Neonicotinoid Insecticides', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341: 326-39.
- Bonmatin, J. M., C. Giorio, V. Girolami, D. Goulson, D. P. Kreutzweiser, C. Krupke, M. Liess, E. Long, M. Marzaro, E. A. D. Mitchell, D. A. Noome, N. Simon-Delso, and A. Tapparo. 2015. 'Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil', *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 35-67.
- Boonen, Brett, Yeranddy A Alpizar, Victor M Meseguer, and Karel Talavera. 2018. 'TRP channels as sensors of bacterial endotoxins', *Toxins*, 10: 326.
- Boulanger, N., P. Boyer, E. Talagrand-Reboul, and Y. Hansmann. 2019. 'Ticks and tick-borne diseases', *Med Mal Infect*, 49: 87-97.

Références

- Boulter, Jim, John Connolly, Evan Deneris, Dan Goldman, Steven Heinemann, and Jim Patrick. 1987. 'Functional expression of two neuronal nicotinic acetylcholine receptors from cDNA clones identifies a gene family', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84: 7763-67.
- Bowman, A. S., L. B. Coons, G. R. Needham, and J. R. Sauer. 1997. 'Tick saliva: recent advances and implications for vector competence', *Medical and Veterinary Entomology*, 11: 277-85.
- Bowman, A. S., and J. R. Sauer. 2004. 'Tick salivary glands: function, physiology and future', *Parasitology*, 129: S67-S81.
- Bowman, AS, JW Dillwith, and JR Sauer. 1996. 'Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance', *Parasitology today*, 12: 388-96.
- Boyard, C., J. Barnouin, S. Bord, P. Gasqui, and G. Vourc'h. 2011. 'Reproducibility of local environmental factors for the abundance of questing Ixodes ricinus nymphs on pastures', *Ticks Tick Borne Dis*, 2: 104-10.
- Boyard, C., J. Barnouin, P. Gasqui, and G. Vourc'H. 2007a. 'Local environmental factors characterizing Ixodes ricinus nymph abundance in grazed permanent pastures for cattle', *Parasitology*, 134: 987-94.
- Boyard, C., J. Barnouin, P. Gasqui, and G. Vourc'H. 2007b. 'Local environmental factors characterizing Ixodes ricinus nymph abundance in grazed permanent pastures for cattle', *Parasitology*, 134: 987-94.
- Brejč, Katjusa, Willem J van Dijk, Remco V Klaassen, Mascha Schuurmans, John van Der Oost, August B Smit, and Titia K Sixma. 2001a. 'Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors', *Nature*, 411: 269-76.
- Brejč, Katjuša, Willem J. van Dijk, Remco V. Klaassen, Mascha Schuurmans, John van der Oost, August B. Smit, and Titia K. Sixma. 2001b. 'Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors', *Nature*, 411: 269-76.
- Brindley, W. A., and A. A. Selim. 1984. 'Synergism and Antagonism in the Analysis of Insecticide Resistance', *Environmental Entomology*, 13: 348-54.
- Broad, Lisa M, Ruud Zwart, Kathy H Pearson, Martin Lee, Louise Wallace, Gordon I McPhie, Renee Emkey, Sean P Hollinshead, Colin P Dell, and S Richard Baker. 2006. 'Identification and pharmacological profile of a new class of selective nicotinic acetylcholine receptor potentiators', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318: 1108-17.
- Brooke W. Bissinger, R. Michael Roe. 2010. 'Tick repellents: Past, present, and future', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96: 17.
- Brossard, M, and S Wikel. 2008. "Tick Immunobiology. Ticks: Biology, Disease and Control. Edited by: Bowman AS, Nuttall PA." In.: Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Brown, Heather A, Donna A Minott, Conrad W Ingram, and Lawrence AD Williams. 1998. 'Biological activities of the extracts and constituents of pimento, *Pimenta dioica* L. against the southern cattle tick, *Boophilus microplus*', *International Journal of Tropical Insect Science*, 18: 9-16.
- Brown, Laurence A., Makoto Ihara, Steven D. Buckingham, Kazuhiko Matsuda, and David B. Sattelle. 2006. 'Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors', *Journal of neurochemistry*, 99: 608-15.
- Buchel, K., J. Bendin, A. Gharbi, S. Rahlenbeck, and H. Dautel. 2015. 'Repellent efficacy of DEET, Icaridin, and EBAAP against *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis* nymphs (Acari, Ixodidae)', *Ticks Tick Borne Dis*, 6: 494-8.

Références

- Büchel, Kerstin, Juliane Bendin, Amina Gharbi, Sibylle Rahlenbeck, and Hans Dautel. 2015. 'Repellent efficacy of DEET, Icaridin, and EBAAP against *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis* nymphs (Acari, Ixodidae)', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6: 494-98.
- Buckingham, S, B Lapied, H le Corronc, and F Sattelle. 1997. 'Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors', *The Journal of experimental biology*, 200: 2685-92.
- Buckingham, Steven David, Luanda Pym, and David Barry Sattelle. 2006. 'Oocytes as an expression system for studying receptor/channel targets of drugs and pesticides', *Xenopus Protocols*: 331-45.
- Buczek, A., K. Bartosik, and P. Kuczynski. 2014. 'Comparison of the toxic effect of pyrethroids on *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* females', *Ann Agric Environ Med*, 21: 263-6.
- Burger, Thomas D, Renfu Shao, Marcelo B Labruna, and Stephen C Barker. 2014. 'Molecular phylogeny of soft ticks (Ixodida: Argasidae) inferred from mitochondrial genome and nuclear rRNA sequences', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5: 195-207.
- Burgh, S de, Kasia Hunter, Chrissie Jackson, Michael Chambers, Corinna Klupiec, and Veronica Smith. 2017. 'Repellency effect of an Imidacloprid/flumethrin (Seresto®) controlled release polymer matrix collar against the Australian paralysis tick (*Ixodes holocyclus*) in dogs', *Parasitology Research*, 116.
- Burton, RF. 1983. 'The composition of animal cells: solutes contributing to osmotic pressure and charge balance', *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 76: 663-71.
- Camicas, Jean-Louis, Jean-Paul Hervy, F. Adam, and P.C. Morel. 1998. *Les tiques du monde (Acarida, Ixodida) : nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition (espèces décrites avant le 1/01/96) = The ticks of the world (Acarida, Ixodida) : nomenclature, described stages, hosts, distribution (including new species described before 1/01/96)* (ORSTOM: Paris).
- Cardenas-de la Garza, J. A., E. De la Cruz-Valadez, J. Ocampo-Candiani, and O. Welsh. 2019. 'Clinical spectrum of Lyme disease', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38: 201-08.
- Carr, Ann L, Robert D Mitchell III, Anirudh Dhammi, Brooke W Bissinger, Daniel E Sonenshine, and R Michael Roe. 2017. 'Tick Haller's organ, a new paradigm for arthropod olfaction: how ticks differ from insects', *International journal of molecular sciences*, 18: 1563.
- Carroll, J. F., V. B. Solberg, J. A. Klun, M. Kramer, and M. Debboun. 2004. 'Comparative Activity of Deet and AI3-37220 Repellents Against the Ticks *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in Laboratory Bioassays', *Journal of Medical Entomology*, 41: 249-54.
- Cartereau, A., C. Martin, and S. H. Thany. 2018. 'Neonicotinoid insecticides differently modulate acetylcholine-induced currents on mammalian alpha7 nicotinic acetylcholine receptors', *Br J Pharmacol*, 175: 1987-98.
- Casida, J. E., and K. A. Durkin. 2013. 'Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects', *Annu Rev Entomol*, 58: 99-117.
- Casida, John E, and Gary B Quistad. 1998. 'Golden age of insecticide research: past, present, or future?', *Annual Review of Entomology*, 43: 1-16.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2000. 'Lyme Disease --- United States, 2000'. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5102a3.htm>.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. 2018. 'Recent Surveillance Data_Lyme disease'. <https://www.cdc.gov/lyme/datasurveillance/recent-surveillance-data.html>.

Références

- Celie, Patrick HN, Sarah E van Rossum-Fikkert, Willem J van Dijk, Katjuša Brejc, August B Smit, and Titia K Sixma. 2004. 'Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures', *Neuron*, 41: 907-14.
- Chamaon, K., R. Schulz, K. H. Smalla, B. Seidel, and E. D. Gundelfinger. 2000. 'Neuronal nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila melanogaster*: the alpha-subunit α_3 and the beta-type subunit ARD co-assemble within the same receptor complex', *FEBS Lett*, 482: 189-92.
- Chamaon, K., K. H. Smalla, U. Thomas, and E. D. Gundelfinger. 2002. 'Nicotinic acetylcholine receptors of *Drosophila*: three subunits encoded by genomically linked genes can co-assemble into the same receptor complex', *J Neurochem*, 80: 149-57.
- Changeux, Jean-Pierre, Michiki Kasai, and Chen-Yuan Lee. 1970. 'Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 67: 1241-47.
- Chatzidaki, Anna, Jarryl M D'Oyley, JasKiran K Gill-Thind, Tom D Sheppard, and Neil S Millar. 2015. 'The influence of allosteric modulators and transmembrane mutations on desensitisation and activation of α_7 nicotinic acetylcholine receptors', *Neuropharmacology*, 97: 75-85.
- Chatzidaki, Anna, and Neil S. Millar. 2015. 'Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors', *Biochemical Pharmacology*, 97: 408-17.
- Chavez-Noriega, Laura E, James H Crona, Mark S Washburn, Arturo Urrutia, Kathryn J Elliott, and Edwin C Johnson. 1997. 'Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\beta_4$, $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_3\beta_4$, $\alpha_4\beta_2$, $\alpha_4\beta_4$ and α_7 expressed in *Xenopus* oocytes', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280: 346-56.
- Chmelar, Jindrich, Eric Calvo, Joao H. F. Pedra, Ivo M. B. Francischetti, and Michail Kotsyfakis. 2012. 'Tick salivary secretion as a source of antihemostatics', *Journal of Proteomics*, 75: 3842-54.
- Chmelar, Jindrich, Carlo J. Oliveira, Pavlina Rezacova, Ivo M. B. Francischetti, Zuzana Kovarova, Gunnar Pejler, Peter Kopacek, José M. C. Ribeiro, Michael Mares, Jan Kopecky, and Michail Kotsyfakis. 2011. 'A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation', *Blood*, 117: 736-44.
- Chrdle, Aleš, Václav Chmelík, and Daniel Růžek. 2016. 'Tick-borne encephalitis: What travelers should know when visiting an endemic country', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 12: 2694-99.
- Cochez, C, P Heyman, D Heylen, M Fonville, P Hengeveld, W Takken, L Simons, and H Sprong. 2015. 'The presence of *Borrelia miyamotoi*, a relapsing fever spirochaete, in questing *Ixodes ricinus* in Belgium and in the Netherlands', *Zoonoses and public health*, 62: 331-33.
- Collin, C., F. Hauser, E. Gonzalez de Valdivia, S. Li, J. Reisenberger, E. M. Carlsen, Z. Khan, N. O. Hansen, F. Puhm, L. Sondergaard, J. Niemiec, M. Heninger, G. R. Ren, and C. J. Grimmelikhuijzen. 2013. 'Two types of muscarinic acetylcholine receptors in *Drosophila* and other arthropods', *Cell Mol Life Sci*, 70: 3231-42.
- Collingridge, Graham L., Richard W. Olsen, John Peters, and Michael Spedding. 2009. 'A nomenclature for ligand-gated ion channels', *Neuropharmacology*, 56: 2-5.
- Colwell, Douglas D, Filipe Dantas-Torres, and Domenico Otranto. 2011. 'Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives', *Veterinary Parasitology*, 182: 14-21.
- Connolly, C.N., and K.A. Wafford. 2004. 'The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function', *Biochemical Society Transactions*, 32: 529-34.

Références

- Cook, Michael J. 2014. 'Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment', *International journal of general medicine*, 8: 1-8.
- Coons, Lewis, and Gerd Alberti. 1999. 'Acari: Ticks.' in.
- Corbel, V., M. Stankiewicz, C. Pennetier, D. Fournier, J. Stojan, E. Girard, M. Dimitrov, J. Molgo, J. M. Hougard, and B. Lapied. 2009. 'Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet', *BMC Biol*, 7: 47.
- Corbel, Vincent, Michel Raymond, Fabrice Chandre, Frédéric Darriet, and Jean-Marc Hougard. 2004. 'Efficacy of insecticide mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say)(Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates', *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 60: 375-80.
- Corbel, Vincent, Maria Stankiewicz, Cédric Pennetier, Didier Fournier, Jure Stojan, Emmanuelle Girard, Mitko Dimitrov, Jordi Molgó, Jean-Marc Hougard, and Bruno Lapied. 2009. 'Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet', *BMC biology*, 7: 1-11.
- Corradi, Jeremías, and Cecilia Bouzat. 2016. 'Understanding the bases of function and modulation of $\alpha 7$ nicotinic receptors: implications for drug discovery', *Molecular Pharmacology*, 90: 288-99.
- Corringer, Pierre-Jean, Nicolas Le Novère, and Jean-Pierre Changeux. 2000. 'Nicotinic receptors at the amino acid level', *Annual review of pharmacology and toxicology*, 40: 431-58.
- Cotté, Violaine, Sarah Bonnet, Danielle Le Rhun, Evelyne Le Naour, Alain Chauvin, Henri-Jean Boulouis, Benoit Lecuelle, Thomas Lilin, and Muriel Vayssier-Taussat. 2008. 'Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*', *Emerging infectious diseases*, 14: 1074.
- Coudert, Pascal. 2019. 'Gestion et choix des antiparasitaires en médecine vétérinaire', *Actualités Pharmaceutiques*, 58: 49-53.
- Courjaret, R., F. Grolleau, and B. Lapied. 2003. 'Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha-bungarotoxin-resistant nAChR $\alpha 1$ in insect neurosecretory cells (DUM neurons)', *Eur J Neurosci*, 17: 2023-34.
- Courjaret, Raphaël, and Bruno Lapied. 2001. 'Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal α -bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons)', *Molecular Pharmacology*, 60: 80-91.
- Couturier, Sabine, Daniel Bertrand, Jean-Marc Matter, Maria-Clemencia Hernandez, Sonia Bertrand, Neil Millar, Soledad Valera, Thomas Barkas, and Marc Ballivet. 1990. 'A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by α -BTX', *Neuron*, 5: 847-56.
- Crespin, L., C. Legros, O. List, H. Tricoire-Leignel, and C. Mattei. 2016. 'Injection of insect membrane in *Xenopus* oocyte: An original method for the pharmacological characterization of neonicotinoid insecticides', *J Pharmacol Toxicol Methods*, 77: 10-6.
- Crossthwaite, Andrew J., Aurelien Bigot, Philippe Camblin, Jim Goodchild, Robert J. Lind, Russell Slater, and Peter Maienfisch. 2017. 'The invertebrate pharmacology of insecticides acting at nicotinic acetylcholine receptors', *Journal of Pesticide Science*, advpub.
- da Silva Mesquita, Rochelly, Andrii Kyrylchuk, Iryna Grafova, Denys Kliukovskyi, Andriy Bezdudnyy, Alexander Rozhenko, Wanderli Pedro Tadei, Markku Leskelä, and Andriy Grafov. 2020. 'Synthesis, molecular docking studies, and larvicidal activity evaluation of new fluorinated neonicotinoids against *Anopheles darlingi* larvae', *PLoS One*, 15: e0227811.

Références

- Daix, Virginie, Hélène Schroeder, N Praet, J-P Georgan, I Chiappino, Laurent Gillet, K De Fays, Yves Decrem, Gérard Leboulle, and Edmond Godfroid. 2007. 'Ixodes ticks belonging to the Ixodes ricinus complex encode a family of anticomplement proteins', *Insect molecular biology*, 16: 155-66.
- Dale, H. H. 1914. 'THE ACTION OF CERTAIN ESTERS AND ETHERS OF CHOLINE, AND THEIR RELATION TO MUSCARINE', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 6: 147.
- Dale, H. H., and H. W. Dudley. 1929. 'The presence of histamine and acetylcholine in the spleen of the ox and the horse', *The Journal of Physiology*, 68: 97-123.
- Dale, RP, AK Jones, C Tamborindeguy, TGE Davies, JS Amey, Sally Williamson, Adrian Wolstenholme, LM Field, MS Williamson, and TK Walsh. 2010. 'Identification of ion channel genes in the Acyrthosiphon pisum genome', *Insect molecular biology*, 19: 141-53.
- Daniel, M., V. Danielova, A. Fialova, M. Maly, B. Kriz, and P. A. Nuttall. 2018. 'Increased Relative Risk of Tick-Borne Encephalitis in Warmer Weather', *Front Cell Infect Microbiol*, 8: 90.
- Daniel, M., V. Danielová, B. Kříž, A. Jirsa, and J. Nožička. 2003. 'Shift of the Tick Ixodes ricinus and Tick-Borne Encephalitis to Higher Altitudes in Central Europe', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 22: 327-28.
- Dantas-Torres, F., G. Capelli, A. Giannelli, R. A. Ramos, R. P. Lia, C. Cantacessi, D. de Caprariis, A. S. De Tommasi, M. S. Latrofa, V. Lacasella, V. D. Tarallo, G. Di Paola, B. Quorollo, E. Breitschwerdt, D. Stanneck, and D. Otranto. 2013. 'Efficacy of an imidacloprid/flumethrin collar against fleas, ticks and tick-borne pathogens in dogs', *Parasit Vectors*, 6: 245.
- Davies, A. R., D. J. Hardick, I. S. Blagbrough, B. V. Potter, A. J. Wolstenholme, and S. Wonnacott. 1999. 'Characterisation of the binding of [³H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors', *Neuropharmacology*, 38: 679-90.
- de Monteiro, Caio Márcio, Ralph Maturano, Erik Daemon, Francisco Eduardo Aragão Catunda-Junior, Fernanda Calmon, Tatiane de Souza Senra, Aline Faza, and Mário Geraldo de Carvalho. 2012. 'Acaricidal activity of eugenol on Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae) and Dermacentor nitens (Acari: Ixodidae) larvae', *Parasitology Research*, 111: 1295-300.
- de Oliveira, Patrícia Rosa, Marcos Aparecido Pizano, Rafael Neodini Remédio, Gervásio Henrique Bechara, Rusleyd Maria Magalhães de Abreu, and Maria Izabel Camargo Mathias. 2015. 'Potential of the chemical dinotefuran in the control of Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged female ticks', *Experimental Parasitology*, 155: 82-88.
- Decrem, Yves, Géraldine Rath, Virginie Blasioli, Philippe Cauchie, Séverine Robert, Jérôme Beaufays, Jean-Marie Frère, Olivier Feron, Jean-Michel Dogné, and Chantal Dessy. 2009. 'Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick Ixodes ricinus, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis', *Journal of Experimental Medicine*, 206: 2381-95.
- Del Fabbro, S. 2015. 'Fencing and mowing as effective methods for reducing tick abundance on very small, infested plots', *Ticks Tick Borne Dis*, 6: 167-72.
- Dermauw, W., A. Ilias, M. Riga, A. Tsagkarakou, M. Grbić, L. Tirry, T. Van Leeuwen, and J. Vontas. 2012. 'The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of Tetranychus urticae: Implications for acaricide toxicology and a novel mutation associated with abamectin resistance', *Insect biochemistry and molecular biology*, 42: 455-65.
- Dethier, VG, Barton L Browne, and Carroll N Smith. 1960. 'The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects', *Journal of Economic Entomology*, 53: 134-36.

Références

- Diaz, J. H. 2016. 'Chemical and Plant-Based Insect Repellents: Efficacy, Safety, and Toxicity', *Wilderness Environ Med*, 27: 153-63.
- Dobson, Susan J., and Stephen C. Barker. 1999. 'Phylogeny of the Hard Ticks (Ixodidae) Inferred from 18S rRNA Indicates That the Genus *Aponomma* is Paraphyletic', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11: 288-95.
- Drakou, C. E., K. E. Tsitsanou, C. Potamitis, D. Fessas, M. Zervou, and S. E. Zographos. 2017. 'The crystal structure of the AgamOBP1•Icaridin complex reveals alternative binding modes and stereo-selective repellent recognition', *Cell Mol Life Sci*, 74: 319-38.
- Duh, Darja, Miroslav Petrovec, and Tatjana Avsic-Zupanc. 2005. 'Molecular characterization of human pathogen *Babesia EU1* in *Ixodes ricinus* ticks from Slovenia', *Journal of Parasitology*, 91: 463-65.
- Dupuis, J., T. Louis, M. Gauthier, and V. Raymond. 2012. 'Insights from honeybee (*Apis mellifera*) and fly (*Drosophila melanogaster*) nicotinic acetylcholine receptors: from genes to behavioral functions', *Neurosci Biobehav Rev*, 36: 1553-64.
- Dupuis, J. P., M. Gauthier, and V. Raymond-Delpech. 2011. 'Expression patterns of nicotinic subunits $\alpha 2$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, and $\beta 1$ affect the kinetics and pharmacology of ACh-induced currents in adult bee olfactory neuropiles', *J Neurophysiol*, 106: 1604-13.
- Easterling, David R, Briony Horton, Philip D Jones, Thomas C Peterson, Thomas R Karl, David E Parker, M James Salinger, Vyacheslav Razuvayev, Neil Plummer, and Paul Jamason. 1997. 'Maximum and minimum temperature trends for the globe', *Science*, 277: 364-67.
- Eastham, Helen M, Robert J Lind, Jane L Eastlake, Barry S Clarke, Paul Towner, Stuart E Reynolds, Adrian J Wolstenholme, and Susan Wonnacott. 1998. 'Characterization of a nicotinic acetylcholine receptor from the insect *Manduca sexta*', *European Journal of Neuroscience*, 10: 879-89.
- ECDC, European Center for Disease Prevention and Control. 2021. 'Tick Maps'. <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps>.
- ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. 2017. 'Factsheet about tick-borne encephalitis (TBE)'. <https://www.ecdc.europa.eu/en/tick-borne-encephalitis/facts/factsheet>.
- Egekwu, N., D. E. Sonenshine, B. W. Bissinger, and R. M. Roe. 2014. 'Transcriptome of the female synganglion of the black-legged tick *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with comparison between Illumina and 454 systems', *PLoS One*, 9: e102667.
- Egyed, László, Péter Élő, Zsuzsanna Sréter-Lancz, Zoltán Széll, Zsuzsanna Balogh, and Tamás Sréter. 2012. 'Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of *Ixodes ricinus* ticks in Hungary', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3: 90-94.
- Elgoyhen, A. Belén, Douglas E. Vetter, Eleonora Katz, Carla V. Rothlin, Stephen F. Heinemann, and Jim Boulter. 2001. ' $\alpha 10$: A determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 3501-06.
- Elgoyhen, Ana B, David S Johnson, Jim Boulter, Douglas E Vetter, and Stephen Heinemann. 1994. ' $\alpha 9$: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells', *Cell*, 79: 705-15.
- Elmhalli, Fawzeia H., Katinka Pålsson, Jan Örberg, and Thomas G. T. Jaenson. 2009. 'Acaricidal effects of *Corymbia citriodora* oil containing para-menthane-3,8-diol against nymphs of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae)', *Experimental and Applied Acarology*, 48: 251-62.

Références

- Erdmanis, L., A. O. O'Reilly, M. S. Williamson, L. M. Field, A. Turberg, and B. A. Wallace. 2012. 'Association of neonicotinoid insensitivity with a conserved residue in the loop d binding region of the tick nicotinic acetylcholine receptor', *Biochemistry*, 51: 4627-9.
- Estrada-Peña, Agustín, Atilio J Mangold, Santiago Nava, José M Venzal, Marcelo Labruna, and Alberto A Guglielmo. 2010. 'A review of the systematics of the tick family Argasidae (Ixodida)', *Acarologia*, 50: 317-33.
- Estrada-Peña, Agustín, Andrei Daniel Mihalca, and Trevor N Petney. 2018. *Ticks of Europe and North Africa: a guide to species identification* (Springer).
- Eusebi, F., E. Palma, M. Amici, and R. Miledi. 2009. 'Microtransplantation of ligand-gated receptor-channels from fresh or frozen nervous tissue into *Xenopus* oocytes: a potent tool for expanding functional information', *Prog Neurobiol*, 88: 32-40.
- Faghhi, Ramin, Sujatha M Gopalakrishnan, Jens Halvard Gronlien, John Malysz, Clark A Briggs, Caroline Wetterstrand, Hilde Ween, Michael P Curtis, Kathy A Sarris, and Gregory A Gfesser. 2009. 'Discovery of 4-(5-(4-Chlorophenyl)-2-methyl-3-propionyl-1 H-pyrrol-1-yl) benzenesulfonamide (A-867744) as a Novel Positive Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor', *Journal of medicinal chemistry*, 52: 3377-84.
- Faulde, M. K., G. Albiez, and O. Nehring. 2010. 'Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET- and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique', *Parasitol Res*, 106: 957-65.
- Faulde, Michael K., Waltraud M. Uedelhoven, and Richard G. Robbins. 2003. 'Contact Toxicity and Residual Activity of Different Permethrin-Based Fabric Impregnation Methods for *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), and *Lepisma saccharina* (Thysanura: Lepismatidae)', *Journal of Medical Entomology*, 40: 935-41.
- Fayyazuddin, Amir, Mahira A Zaheer, P Robin Hiesinger, and Hugo J Bellen. 2006. 'The nicotinic acetylcholine receptor $D\alpha 7$ is required for an escape behavior in *Drosophila*', *PLoS biology*, 4: e63.
- Ferreira, Lorena Lopes, Jaires Gomes de Oliveira Filho, Gabriel Moura Mascarim, Adalberto A Pérez de León, and Lígia Miranda Ferreira Borges. 2017. 'In vitro repellency of DEET and β -citronellol against the ticks *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and *Amblyomma sculptum*', *Veterinary Parasitology*, 239: 42-45.
- Galzi, Jean-Luc, Daniel Bertrand, Anne Devillers-Thiéry, Frédéric Revah, Sonia Bertrand, and Jean-Pierre Changeux. 1991. 'Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis', *FEBS Letters*, 294: 198-202.
- Galzi, Jean-Luc, Frédéric Revah, Diane Black, Maurice Goeldner, Christian Hirth, and Jean-Pierre Changeux. 1990. 'Identification of a novel amino acid alpha-tyrosine 93 within the cholinergic ligands-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligands-binding sites', *Journal of Biological Chemistry*, 265: 10430-37.
- Gao, J.-R., J. M. Deacutis, and J. G. Scott. 2007. 'The nicotinic acetylcholine receptor subunit $M\delta\alpha 6$ from *Musca domestica* is diversified via post-transcriptional modification', *Insect molecular biology*, 16: 325-34.
- Garcia-Vozmediano, Aitor, Aleksandra Iwona Krawczyk, Hein Sprong, Luca Rossi, Elisa Ramassa, and Laura Tomassone. 2020. 'Ticks climb the mountains: Ixodid tick infestation and infection by tick-borne pathogens in the Western Alps', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11: 101489.
- Gardulf, Ann, Ingrid Wohlfart, and Rolf Gustafson. 2004. 'A Prospective Cross-Over Field Trial Shows Protection of Lemon Eucalyptus Extract Against Tick Bites', *Journal of Medical Entomology*, 41: 1064-67.

Références

- Gassner, Fedor, Kayleigh M Hansford, and Jolyon M Medlock. 2016. '13. Greener cities, a wild card for ticks?', *Ecology and prevention of Lyme borreliosis*, 4: 187.
- Gay, Elaine A, and Jerrel L Yakel. 2007. 'Gating of nicotinic ACh receptors; new insights into structural transitions triggered by agonist binding that induce channel opening', *The Journal of physiology*, 584: 727-33.
- Genchi, Marco, Paola Prati, Nadia Vicari, Andrea Manfredini, Luciano Sacchi, Emanuela Clementi, Claudio Bandi, Sara Epis, and Massimo Fabbi. 2015. 'Francisella tularensis: no evidence for transovarial transmission in the tularemia tick vectors Dermacentor reticulatus and Ixodes ricinus', *PLoS One*, 10: e0133593.
- George, J. E., J. M. Pound, and R. B. Davey. 2004. 'Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides', *Parasitology*, 129 Suppl: S353-66.
- Gern, L, A Estrada-Pena, F Frandsen, JS Gray, TGT Jaenson, F Jongejan, O Kahl, E Korenberg, R Mehl, and PA Nuttall. 1998. 'European reservoir hosts of Borrelia burgdorferi sensu lato', *Zentralblatt für bakteriologie*, 287: 196-204.
- Gibbons, David, Christy Morrissey, and Pierre Mineau. 2015. 'A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife', *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 103-18.
- Gill-Thind, JasKiran K., Persis Dhankher, Jarryl M. D'Oyley, Tom D. Sheppard, and Neil S. Millar. 2015. 'Structurally Similar Allosteric Modulators of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Exhibit Five Distinct Pharmacological Effects*', *Journal of Biological Chemistry*, 290: 3552-62.
- Goldberg, Frank, Bernd Grünwald, Hendrik Rosenboom, and Randolph Menzel. 1999. 'Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee Apis mellifera', *The Journal of Physiology*, 514: 759-68.
- Goodyer, L. I., A. M. Croft, S. P. Frances, N. Hill, S. J. Moore, S. P. Onyango, and M. Debboun. 2010. 'Expert review of the evidence base for arthropod bite avoidance', *J Travel Med*, 17: 182-92.
- Gotti, Cecilia, Francesco Clementi, Alice Fornari, Annalisa Gaimarri, Stefania Guiducci, Irene Manfredi, Milena Moretti, Patrizia Pedrazzi, Luca Pucci, and Michele Zoli. 2009. 'Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors', *Biochemical Pharmacology*, 78: 703-11.
- Gotti, Cecilia, Milena Moretti, Annalisa Gaimarri, Alessio Zanardi, Francesco Clementi, and Michele Zoli. 2007. 'Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors', *Biochemical Pharmacology*, 74: 1102-11.
- Goulson, Dave. 2013. 'An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides', *Journal of Applied Ecology*, 50: 977-87.
- Graf, J. F., R. Gogolewski, N. Leach-Bing, G. A. Sabatini, M. B. Molento, E. L. Bordin, and G. J. Arantes. 2004. 'Tick control: an industry point of view', *Parasitology*, 129: S427-S42.
- Grauso, M, RA Reenan, E Culetto, and DB Sattelle. 2002. 'Novel Putative Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Genes, D $\alpha 5$, D $\alpha 6$ and D $\alpha 7$, in Drosophila melanogaster Identify a New and Highly Conserved Target of Adenosine Deaminase Acting on RNA-Mediated A-to-I Pre-mRNA Editing', *Genetics*, 160: 1519-33.
- Grbić, Miodrag, Thomas Van Leeuwen, Richard M. Clark, Stephane Rombauts, Pierre Rouzé, Vojislava Grbić, Edward J. Osborne, Wannes Dermauw, Phuong Cao Thi Ngoc, Félix Ortego, Pedro Hernández-Crespo, Isabel Diaz, Manuel Martinez, Maria Navajas, Élio Sucena, Sara Magalhães, Lisa Nagy, Ryan M. Pace, Sergej Djuranović, Guy Smagghe, Masatoshi Iga, Olivier Christiaens, Jan A. Veenstra, John Ewer, Rodrigo Mancilla Villalobos, Jeffrey L. Hutter, Stephen D. Hudson, Marisela Velez, Soojin V. Yi, Jia

Références

- Zeng, Andre Pires-daSilva, Fernando Roch, Marc Cazaux, Marie Navarro, Vladimir Zhurov, Gustavo Acevedo, Anica Bjelica, Jeffrey A. Fawcett, Eric Bonnet, Cindy Martens, Guy Baele, Lothar Wissler, Aminael Sanchez-Rodriguez, Luc Tirry, Catherine Blais, Kristof Demeestere, Stefan R. Henz, T. Ryan Gregory, Johannes Mathieu, Lou Verdon, Laurent Farinelli, Jeremy Schmutz, Erika Lindquist, René Feyereisen, and Yves Van de Peer. 2011. 'The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations', *Nature*, 479: 487-92.
- Grønlien, Jens Halvard, Monika Håkerud, Hilde Ween, Kirsten Thorin-Hagene, Clark A Briggs, Murali Gopalakrishnan, and John Malysz. 2007. 'Distinct profiles of $\alpha 7$ nAChR positive allosteric modulation revealed by structurally diverse chemotypes', *Molecular Pharmacology*, 72: 715-24.
- Grutter, Thomas, Lia Prado de Carvalho, Virginie Dufresne, Antoine Taly, Stuart J Edelman, and Jean-Pierre Changeux. 2005. 'Molecular tuning of fast gating in pentameric ligand-gated ion channels', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 18207-12.
- Guerrero, F, A Pérez de León, R Rodriguez-Vivas, Nick Jonsson, R Miller, and RENATO Andreotti. 2014. 'Acaricide research and development, resistance and resistance monitoring', *Sonenshine DE, Roe RM, editors*, 2: 353-74.
- Guglielmone, Alberto A.; Robbins, Richard G.; Apanaskevich, Dmitry A.; Petney, Trevor N.; Estrada-Pena, Agustín; Horak, Ivan Gerard; Shao, Renfu; Barker, Stephen C. . 2010. 'The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world : a list of valid species names': 12.
- Gulia-Nuss, M., A. B. Nuss, J. M. Meyer, D. E. Sonenshine, R. M. Roe, R. M. Waterhouse, D. B. Sattelle, J. de la Fuente, J. M. Ribeiro, K. Megy, J. Thimmapuram, J. R. Miller, B. P. Walenz, S. Koren, J. B. Hostetler, M. Thiagarajan, V. S. Joardar, L. I. Hannick, S. Bidwell, M. P. Hammond, S. Young, Q. Zeng, J. L. Abrudan, F. C. Almeida, N. Ayllon, K. Bhide, B. W. Bissinger, E. Bonzon-Kulichenko, S. D. Buckingham, D. R. Caffrey, M. J. Caimano, V. Croset, T. Driscoll, D. Gilbert, J. J. Gillespie, G. I. Giraldo-Calderon, J. M. Grabowski, D. Jiang, S. M. S. Khalil, D. Kim, K. M. Kocan, J. Koci, R. J. Kuhn, T. J. Kurtti, K. Lees, E. G. Lang, R. C. Kennedy, H. Kwon, R. Perera, Y. Qi, J. D. Radolf, J. M. Sakamoto, A. Sanchez-Gracia, M. S. Severo, N. Silverman, L. Simo, M. Tojo, C. Tornador, J. P. Van Zee, J. Vazquez, F. G. Vieira, M. Villar, A. R. Wespiser, Y. Yang, J. Zhu, P. Arensbarger, P. V. Pietrantonio, S. C. Barker, R. Shao, E. M. Zdobnov, F. Hauser, C. J. P. Grimmelikhuijzen, Y. Park, J. Rozas, R. Benton, J. H. F. Pedra, D. R. Nelson, M. F. Unger, J. M. C. Tubio, Z. Tu, H. M. Robertson, M. Shumway, G. Sutton, J. R. Wortman, D. Lawson, S. K. Wikel, V. M. Nene, C. M. Fraser, F. H. Collins, B. Birren, K. E. Nelson, E. Caler, and C. A. Hill. 2016. 'Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease', *Nat Commun*, 7: 10507.
- Guzmán, Gisela R, John Santiago, Ariamsi Ricardo, Ricardo Martí-Arbona, Legier V Rojas, and José A Lasalde-Dominicci. 2003. 'Tryptophan scanning mutagenesis in the αM_3 transmembrane domain of the *Torpedo californica* acetylcholine receptor: functional and structural implications', *Biochemistry*, 42: 12243-50.
- Hall, Tom. 1999. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." In *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 95-98.
- Hamel, HD. 1987. 'The use of flumethrin 1% pour-on for the control of *Amblyomma* spp. in various Southern African countries'.
- Hannier, Sigrid, Janet Liversidge, Jeremy M Sternberg, and Alan S Bowman. 2004. 'Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission', *Immunology*, 113: 401-08.
- Hansen, Scott B, Gerlind Sulzenbacher, Tom Huxford, Pascale Marchot, Palmer Taylor, and Yves Bourne. 2005. 'Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations', *The EMBO Journal*, 24: 3635-46.

Références

- Harpsøe, Kasper, Helle Hald, Daniel B Timmermann, Marianne L Jensen, Tino Dyhring, Elsebet Ø Nielsen, Dan Peters, Thomas Balle, Michael Gajhede, and Jette S Kastrup. 2013. 'Molecular determinants of subtype-selective efficacies of cytisine and the novel compound NS3861 at heteromeric nicotinic acetylcholine receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 288: 2559-70.
- Hartelt, Kathrin, Rainer Oehme, Henning Frank, Stefan O Brockmann, Dieter Hassler, and Peter Kimmig. 2004. 'Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (Ehrlichia sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany', *International Journal of Medical Microbiology Supplements*, 293: 86-92.
- Hermans-Borgmeyer, Irmgard, Dieter Zopf, Rolf-Peter Ryseck, Bernd Hovemann, Heinrich Betz, and Eckart D. Gundelfinger. 1986. 'Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from *Drosophila*', *The EMBO Journal*, 5: 1503-08.
- Hermesen, Bernhard, Eva Stetzer, Rüdiger Thees, Reinhard Heiermann, Andre Schratzenholz, Ulrich Ebbinghaus, Axel Kretschmer, Christoph Methfessel, Sigrid Reinhardt, and Alfred Maelicke. 1998. 'Neuronal nicotinic receptors in the Locust *Locusta migratoria*: cloning and expression', *Journal of Biological Chemistry*, 273: 18394-404.
- Herwaldt, Barbara L, Simone Cacciò, Filippo Gherlinzoni, Horst Aspöck, Susan B Slemenda, PierPaolo Piccaluga, Giovanni Martinelli, Renate Edelhofer, Ursula Hollenstein, and Giovanni Poletti. 2003. 'Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe', *Emerging infectious diseases*, 9: 943.
- Hess, E, and M Vlimant. 1986. 'Leg sense organs of ticks.' in, *Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks* (John Wiley & Sons).
- Hirata, Koichi, Ryutaro Kiyota, Akira Matsuura, Satoshi Toda, Atsushi Yamamoto, and Takao Iwasa. 2015. 'Association between the R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit of *Aphis gossypii* and the differential resistance to acetamiprid and imidacloprid', *Journal of Pesticide Science*: D14-092.
- Hladik, Michelle L., Anson R. Main, and Dave Goulson. 2018. 'Environmental Risks and Challenges Associated with Neonicotinoid Insecticides', *Environmental Science & Technology*, 52: 3329-35.
- Hoffman, Ronald, Edward J Benz Jr, Leslie E Silberstein, Helen Heslop, John Anastasi, and Jeffrey Weitz. 2013. *Hematology: basic principles and practice* (Elsevier Health Sciences).
- Holt, Ben G, Jean-Philippe Lessard, Michael K Borregaard, Susanne A Fritz, Miguel B Araújo, Dimitar Dimitrov, Pierre-Henri Fabre, Catherine H Graham, Gary R Graves, and Knud A Jønsson. 2013. 'An update of Wallace's zoogeographic regions of the world', *Science*, 339: 74-78.
- Honda, Hideo, Motohiro Tomizawa, and John E. Casida. 2006. 'Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors: Neonicotinoid Binding Site Specificity Is Usually but Not Always Conserved with Varied Substituents and Species', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3365-71.
- Honig, V., P. Svec, L. Marek, T. Mrkvicka, Z. Dana, M. V. Wittmann, O. Masar, D. Szturcova, D. Ruzek, K. Pfister, and L. Grubhoffer. 2019. 'Model of Risk of Exposure to Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis Virus-Infected Ticks in the Border Area of the Czech Republic (South Bohemia) and Germany (Lower Bavaria and Upper Palatinate)', *International journal of environmental research and public health*, 16.
- Hoogstraal, Harry, Hilda Y Wassef, Coppelia Hays, and James E Keirans. 1985. '*Ornithodoros* (*Alectorobius*) *spheniscus* n. sp.[Acarina: Ixodoidea: Argasidae: *Ornithodoros* (*Alectorobius*) *capensis* group], a tick parasite of the Humboldt penguin in Peru', *The Journal of parasitology*: 635-44.
- Hoopengardner, Barry, Tarun Bhalla, Cynthia Staber, and Robert Reenan. 2003. 'Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics', *Science*, 301: 832-36.

Références

- Hovius, JWR, N Ramamoorthi, C Van't Veer, KA De Groot, AM Nijhof, F Jongejan, AP Van Dam, and E Fikrig. 2007. 'Identification of Salp15 homologues in Ixodes ricinus ticks', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7: 296-303.
- Huang, Yao, Martin S Williamson, Alan L Devonshire, John D Windass, Stuart J Lansdell, and Neil S Millar. 1999. 'Molecular characterization and imidacloprid selectivity of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the peach-potato aphid *Myzus persicae*', *Journal of neurochemistry*, 73: 380-89.
- Hurst, Raymond S, Mihaly Hajós, Mario Raggenbass, Theron M Wall, Nicole R Higdon, Judy A Lawson, Karen L Rutherford-Root, Mitchell B Berkenpas, WE Hoffmann, and David W Piotrowski. 2005. 'A novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization', *Journal of Neuroscience*, 25: 4396-405.
- Ihara, Makoto, Laurence A. Brown, Chiharu Ishida, Hiroshi Okuda, David B. Sattelle, and Kazuhiko Matsuda. 2006. 'Actions of imidacloprid, clothianidin and related neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors of American cockroach neurons and their relationships with insecticidal potency', *Journal of Pesticide Science*, 31: 35-40.
- Ihara, Makoto, Kazuhiko Matsuda, Maiko Otake, Morihiko Kuwamura, Masaru Shimomura, Koichiro Komai, Miki Akamatsu, Valérie Raymond, and David B Sattelle. 2003. 'Diverse actions of neonicotinoids on chicken $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and Drosophila–chicken $SAD\beta 2$ and $ALS\beta 2$ hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes', *Neuropharmacology*, 45: 133-44.
- Ihara, Makoto, Toshihide Okajima, Atsuko Yamashita, Takuma Oda, Koichi Hirata, Hisashi Nishiwaki, Takako Morimoto, Miki Akamatsu, Yuji Ashikawa, and Shun'ichi Kuroda. 2008. 'Crystal structures of *Lymnaea stagnalis* AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin', *Invertebrate Neuroscience*, 8: 71-81.
- Ihara, Makoto, David B Sattelle, and Kazuhiko Matsuda. 2015. 'Probing new components (loop G and the α – α interface) of neonicotinoid binding sites on nicotinic acetylcholine receptors', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121: 47-52.
- Itier, Valérie, and Daniel Bertrand. 2001. 'Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function', *FEBS Letters*, 504: 118-25.
- Jaenson, T. G., and E. Lindgren. 2011. 'The range of *Ixodes ricinus* and the risk of contracting Lyme borreliosis will increase northwards when the vegetation period becomes longer', *Ticks Tick Borne Dis*, 2: 44-9.
- Jaenson, T. G. T., K. Pålsson, and A. K. Borg-Karlson. 2005. 'Evaluation of extracts and oils of tick-repellent plants from Sweden', *Medical and Veterinary Entomology*, 19: 345-52.
- Jaenson, TGT. 1991. 'The epidemiology of Lyme borreliosis', *Parasitology today*, 7: 39-45.
- Jaenson, Thomas G. T., Samira Garboui, and Katinka Pålsson. 2006. 'Repellency of Oils of Lemon Eucalyptus, Geranium, and Lavender and the Mosquito Repellent MyggA Natural to *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the Laboratory and Field', *Journal of Medical Entomology*, 43: 731-36.
- Jaenson, Thomas GT, David GE Jaenson, Lars Eisen, Erik Petersson, and Elisabet Lindgren. 2012. 'Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden', *Parasites & vectors*, 5: 1-15.
- Jayakar, Selwyn S., William P. Dailey, Roderic G. Eckenhoff, and Jonathan B. Cohen. 2013. 'Identification of Propofol Binding Sites in a Nicotinic Acetylcholine Receptor with a Photoreactive Propofol Analog*', *Journal of Biological Chemistry*, 288: 6178-89.
- Jeschke, P., and R. Nauen. 2008. 'Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry', *Pest Manag Sci*, 64: 1084-98.

Références

- Jin, Xiaochun, and Joe Henry Steinbach. 2011. 'A portable site: a binding element for 17 β -estradiol can be placed on any subunit of a nicotinic $\alpha_4\beta_2$ receptor', *Journal of Neuroscience*, 31: 5045-54.
- Jin, Yongfeng, Nan Tian, Jun Cao, Jing Liang, Zhaolin Yang, and Jianning Lv. 2007. 'RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit alpha6 transcript: evolutionary conservation, divergence and regulation', *BMC Evolutionary Biology*, 7: 1-12.
- Jones, A. K., M. Grauso, and D. B. Sattelle. 2005a. 'The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*', *Genomics*, 85: 176-87.
- Jones, A. K., and D. B. Sattelle. 2007. 'The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*', *BMC Genomics*, 8: 327.
- Jones, Andrew K, Agata N Bera, Kristin Lees, and David B Sattelle. 2010. 'The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*', *Heredity*, 104: 247-59.
- Jones, Andrew K, Delphine Goven, Josy-Anne Froger, Alexandre Bantz, and Valerie Raymond. 2021. 'The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamilies of the cockroaches *Blattella germanica* and *Periplaneta americana*', *Pest Management Science*.
- Jones, Andrew K, Marta Grauso, and David B Sattelle. 2005b. 'The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*', *Genomics*, 85: 176-87.
- Jones, Andrew K, Valerie Raymond-Delpech, Steeve H Thany, Monique Gauthier, and David B Sattelle. 2006. 'The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*', *Genome research*, 16: 1422-30.
- Jones, Andrew K, and David B Sattelle. 2010. 'Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits.' in, *Insect nicotinic acetylcholine receptors* (Springer).
- Jongejan, F., and G. Uilenberg. 2004. 'The global importance of ticks', *Parasitology*, 129 Suppl: S3-14.
- Kagabu, Shinzo. 2003. 'Molecular design of neonicotinoids: past, present and future', *Chemistry of crop protection: progress and prospects in science and regulation*: 193-212.
- Kagabu, Shinzo, Kazuhiko Matsuda, and Koichiro Komai. 2002. 'Preparation of Dinotefuran Related Compounds and Agonistic Action on SAD?? Hybrid Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes', *Journal of Pesticide Science*, 27: 374-77.
- Kaiser, R. 1995. 'Tick-borne encephalitis in southern Germany', *The Lancet*, 345: 463.
- Kalappa, B. I., and V. V. Uteshev. 2013. 'The dual effect of PNU-120596 on α_7 nicotinic acetylcholine receptor channels', *Eur J Pharmacol*, 718: 226-34.
- Karbowiak, G., B. Biernat, T. Szewczyk, and H. Sytykiewicz. 2015. 'The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 1. The general pattern', *Ann Parasitol*, 61: 221-8.
- Karlin, Arthur. 2002. 'Emerging structure of the Nicotinic Acetylcholine receptors', *Nature Reviews Neuroscience*, 3: 102-14.
- Katz, B., and R. Miledi. 1968. 'The role of calcium in neuromuscular facilitation', *J Physiol*, 195: 481-92.
- Katz, T. M., J. H. Miller, and A. A. Hebert. 2008. 'Insect repellents: historical perspectives and new developments', *J Am Acad Dermatol*, 58: 865-71.

Références

- Keirans, James E, Carleton M Clifford, Harry Hoogstraal, and Emmett R Easton. 1976. 'Discovery of *Nuttalliella namaqua* Bedford (Acarina: Ixodoidea: Nuttalliellidae) in Tanzania and redescription of the female based on scanning electron microcopy', *Annals of the Entomological Society of America*, 69: 926-32.
- Keirans, JE. 1992. 'Systematics of the Ixodida (Argasidae, Ixodidae, Nuttalliellidae): an overview and some problems', *Tick vector biology*: 1-21.
- Kelly, Patrick J, Helene M Lucas, Craig M Randolph, Kate Ackerson, Jason K Blackburn, and Michael J Dark. 2014. 'Efficacy of slow-release tags impregnated with aggregation-attachment pheromone and deltamethrin for control of *Amblyomma variegatum* on St. Kitts, West Indies', *Parasites & vectors*, 7: 1-8.
- Kemp, DH, BF Stone, and KC Binnington. 1982. 'Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response.' in, *Physiology of ticks* (Elsevier).
- Keren, Hadas, Galit Lev-Maor, and Gil Ast. 2010. 'Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function', *Nature Reviews Genetics*, 11: 345-55.
- Keyser, Kent T, LR Britto, Ralf Schoepfer, Paul Whiting, John Cooper, William Conroy, Agnieszka Brozowska-Precht, Harvey J Karten, and Jon Lindstrom. 1993. 'Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina', *Journal of Neuroscience*, 13: 442-54.
- Kindt, F., S. Wiegand, V. Niemeier, J. Kupfer, C. Löser, M. Nilles, H. Kürzen, W. Kummer, U. Gieler, and R.V. Haberberger. 2008. 'Reduced expression of nicotinic α subunits 3, 7, 9 and 10 in lesional and nonlesional atopic dermatitis skin but enhanced expression of α subunits 3 and 5 in mast cells', *British Journal of Dermatology*, 159: 847-57.
- Kiryama, Kazuhisa, Hisashi Nishiwaki, Yoshiaki Nakagawa, and Keiichiro Nishimura. 2003. 'Insecticidal activity and nicotinic acetylcholine receptor binding of dinotefuran and its analogues in the housefly, *Musca domestica*', *Pest Management Science*, 59: 1093-100.
- Kirkland, Willis L. 1971. 'Ultrastructural changes in the nymphal salivary glands of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, during feeding', *Journal of Insect Physiology*, 17: 1933-46.
- Kjemtrup, AM, and Patricia A Conrad. 2000. 'Human babesiosis: an emerging tick-borne disease', *Int J Parasitol*, 30: 1323-37.
- Klompen, Hans, and David Grimaldi. 2001. 'First Mesozoic Record of a Parasitiform Mite: a Larval Argasid Tick in Cretaceous Amber (Acari: Ixodida: Argasidae)', *Annals of the Entomological Society of America*, 94: 10-15.
- Klompen, J. S. H., W. C. Black, J. E. Keirans, and J. H. Oliver. 1996. 'Evolution of Ticks', *Annual Review of Entomology*, 41: 141-61.
- Klompen, JSH, and JH Oliver. 1993. 'Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae)', *Systematic entomology*, 18: 313-31.
- Knap, N., and T. Avsic-Zupanc. 2015. 'Factors affecting the ecology of tick-borne encephalitis in Slovenia', *Epidemiology and Infection*, 143: 2059-67.
- Knap, N., E. Durmisi, A. Saksida, M. Korva, M. Petrovec, and T. Avsic-Zupanc. 2009. 'Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia', *Vet Parasitol*, 164: 275-81.
- Kollaritsch, Herwig, Václav Chmelík, Irina Dontsenko, Anna Grzeszczuk, Maciej Kondrusik, Vytautas Usonis, and András Lakos. 2011. 'The current perspective on tick-borne encephalitis awareness and prevention in six Central and Eastern European countries: Report from a meeting of experts convened to discuss TBE in their region', *Vaccine*, 29: 4556-64.

Références

- Kolonin, G. V. 2009. 'Faune of Ixodid Ticks of the World (Acari, Ixodidae)'.
Krause, R. M., B. Buisson, S. Bertrand, P. J. Corringier, J. L. Galzi, J. P. Changeux, and D. Bertrand. 1998. 'Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor', *Mol Pharmacol*, 53: 283-94.
Kurtenbach, K., K. Hanincova, J. I. Tsao, G. Margos, D. Fish, and N. H. Ogden. 2006. 'Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis', *Nat Rev Microbiol*, 4: 660-9.
Kuryatov, Alexandre, Jennifer Onksen, and Jon Lindstrom. 2008. 'Roles of Accessory Subunits in $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptors', *Molecular Pharmacology*, 74: 132-43.
Kusano, K, R Miledi, and J Stinnakre. 1982. 'Cholinergic and catecholaminergic receptors in the Xenopus oocyte membrane', *The Journal of Physiology*, 328: 143-70.
L'Hostis, Monique, Henri Dumon, Arnaud Fusade, Sandrine Lazareff, and André Gorenflot. 1996. 'Seasonal incidence of Ixodes ricinus ticks (Acari: ixodidae) on rodents in western France', *Experimental & applied acarology*, 20: 359-68.
Lane, R. S., J. Piesman, and W. Burgdorfer. 1991. 'Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe', *Annu Rev Entomol*, 36: 587-609.
Langley, J. N. 1905. 'On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari', *The Journal of Physiology*, 33: 374-413.
Lansdell, Stuart J, Toby Collins, Jim Goodchild, and Neil S Millar. 2012. 'The Drosophila nicotinic acetylcholine receptor subunits D $\alpha 5$ and D $\alpha 7$ form functional homomeric and heteromeric ion channels', *BMC Neuroscience*, 13: 1-11.
Lansdell, Stuart J, and Neil S Millar. 2000a. 'Cloning and heterologous expression of D $\alpha 4$, a Drosophila neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly', *Neuropharmacology*, 39: 2604-14.
Lansdell, Stuart J, and Neil S Millar. 2000b. 'The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, α -bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity', *Neuropharmacology*, 39: 671-79.
Lapied, Bruno, Herve' Le Corronc, and Bernard Hue. 1990. 'Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells', *Brain Research*, 533: 132-36.
Lavialle-Defaix, Céline, Véronique Apaire-Marchais, Christian Legros, Cédric Penner, Aly Mohamed, Patricia Licznar, Vincent Corbel, and Bruno Lapied. 2011. 'Anopheles gambiae mosquito isolated neurons: A new biological model for optimizing insecticide/repellent efficacy', *Journal of Neuroscience Methods*, 200: 68-73.
Le Goff, Gaëlle, and Maeva Giraud. 2019. 'Effects of Pesticides on the Environment and Insecticide Resistance.' in Jean-François Picimbon (ed.), *Olfactory Concepts of Insect Control - Alternative to insecticides: Volume 1* (Springer International Publishing: Cham).
Le Mauff, A., H. Chouikh, A. Cartreau, C. L. Charvet, C. Neveu, C. Rispe, O. Plantard, E. Taillebois, and S. H. Thany. 2020. 'Nicotinic acetylcholine receptors in the synganglion of the tick Ixodes ricinus: Functional characterization using membrane microtransplantation', *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 14: 144-51.
Le Novere, Nicolas, Pierre-Jean Corringier, and Jean-Pierre Changeux. 2002. 'The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences', *Journal of Neurobiology*, 53: 447-56.

Références

- Leboulle, Gérard, Mara Crippa, Yves Decrem, Naceur Mejri, Michel Brossard, Alex Bollen, and Edmond Godfroid. 2002. 'Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from Ixodes ricinus ticks', *Journal of Biological Chemistry*, 277: 10083-89.
- Lee, Chih-Hung, Chang Zhu, John Malysz, Thomas Campbell, Thomas Shaughnessy, Prisca Honore, James Polakowski, and Murali Gopalakrishnan. 2011. ' $\alpha_4\beta_2$ neuronal nicotinic receptor positive allosteric modulation: an approach for improving the therapeutic index of $\alpha_4\beta_2$ nAChR agonists in pain', *Biochemical Pharmacology*, 82: 959-66.
- Lee, CY, and LF Tseng. 1966. 'Distribution of Bungarus multicinctus venom following envenomation', *Toxicon*, 3: 281-88.
- Lee, Daewoo, and Diane K O'dowd. 1999. 'Fast excitatory synaptic transmission mediated by nicotinic acetylcholine receptors in Drosophila neurons', *Journal of Neuroscience*, 19: 5311-21.
- Lee, S. J., M. Tomizawa, and J. E. Casida. 2003. 'Nereistoxin and cartap neurotoxicity attributable to direct block of the insect nicotinic receptor/channel', *J Agric Food Chem*, 51: 2646-52.
- Leech, C. A., P. Jewess, J. Marshall, and D. B. Sattelle. 1991. 'Nitromethylene actions on in situ and expressed insect nicotinic acetylcholine receptors', *FEBS Letters*, 290: 90-94.
- Lees, ANTONY DAVID. 1946. 'The water balance in Ixodes ricinus L. and certain other species of ticks', *Parasitology*, 37: 1-20.
- Lees, K., A. K. Jones, K. Matsuda, M. Akamatsu, D. B. Sattelle, D. J. Woods, and A. S. Bowman. 2014. 'Functional characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit from the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus', *Int J Parasitol*, 44: 75-81.
- Lees, K., D. J. Woods, and A. S. Bowman. 2010. 'Transcriptome analysis of the synganglion from the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus', *Insect Mol Biol*, 19: 273-82.
- Lees, Kristin, and Alan S Bowman. 2007. 'Tick neurobiology: recent advances and the post-genomic era', *Invertebrate Neuroscience*, 7: 183-98.
- Levandoski, Mark M, Barbara Piket, and Jane Chang. 2003. 'The anthelmintic levamisole is an allosteric modulator of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors', *European journal of pharmacology*, 471: 9-20.
- Li, Jian, Ying Shao, Zhiping Ding, Haibo Bao, Zewen Liu, Zhaojun Han, and Neil S Millar. 2010. 'Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid', *Insect biochemistry and molecular biology*, 40: 17-22.
- Li, Sen, Lucy Gilbert, Sophie O. Vanwambeke, Jianjun Yu, Bethan V. Purse, and Paula A. Harrison. 2019. 'Lyme Disease Risks in Europe under Multiple Uncertain Drivers of Change', *Environmental Health Perspectives*, 127: 067010.
- Lind, Robert J, Martin S Clough, Fergus GP Earley, Susan Wonnacott, and Stuart E Reynolds. 1999. 'Characterisation of multiple α -bungarotoxin binding sites in the aphid Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)', *Insect biochemistry and molecular biology*, 29: 979-88.
- Lind, Robert J., Martin S. Clough, Stuart E. Reynolds, and Fergus G. P. Earley. 1998. '[³H]Imidacloprid Labels High- and Low-Affinity Nicotinic Acetylcholine Receptor-like Binding Sites in the Aphid Myzus persicae (Hemiptera: Aphididae)', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62: 3-14.
- Lindgren, Elisabet, Thomas GT Jaenson, Bettina Menne, and World Health Organization. 2006. "Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures." In.: Copenhagen: WHO Regional Office for Europe.

Références

- Lindquist, L. 2008. 'Tick-borne encephalitis (TBE) in childhood', *Acta Paediatr*, 97: 532-4.
- Lindstrom, J. 1997. 'Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease', *Mol Neurobiol*, 15: 193-222.
- Liu, Zewen, Martin S Williamson, Stuart J Lansdell, Zhaojun Han, Ian Denholm, and Neil S Millar. 2006. 'A nicotinic acetylcholine receptor mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoid insecticides', *Journal of neurochemistry*, 99: 1273-81.
- Lukas, R. J., J. P. Changeux, N. Le Novere, E. X. Albuquerque, D. J. Balfour, D. K. Berg, D. Bertrand, V. A. Chiappinelli, P. B. Clarke, A. C. Collins, J. A. Dani, S. R. Grady, K. J. Kellar, J. M. Lindstrom, M. J. Marks, M. Quik, P. W. Taylor, and S. Wonnacott. 1999. 'International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits', *Pharmacol Rev*, 51: 397-401.
- Maguire, Janet J, Rhoda E Kuc, and Anthony P Davenport. 2012. 'Radioligand binding assays and their analysis.' in, *Receptor binding techniques* (Springer).
- Mans, Ben J, Daniel De Klerk, Ronel Pienaar, and Abdalla A Latif. 2011. 'Nuttalliella namaqua: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks', *PLoS One*, 6: e23675.
- Mans, Ben J., Daniel G. de Klerk, Ronel Pienaar, and Abdalla A. Latif. 2014. 'The host preferences of Nuttalliella namaqua (Ixodoidea: Nuttalliellidae): a generalist approach to surviving multiple host-switches', *Experimental and Applied Acarology*, 62: 233-40.
- Mansfield, KL, N Johnson, LP Phipps, JR Stephenson, AR Fooks, and T Solomon. 2009. 'Tick-borne encephalitis virus—a review of an emerging zoonosis', *Journal of General Virology*, 90: 1781-94.
- Markussen, Mette DK, and Michael Kristensen. 2010. 'Low expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit M α 2 in neonicotinoid-resistant strains of *Musca domestica* L', *Pest Management Science*, 66: 1257-62.
- Marotta, Christopher B, Iva Rreza, Henry A Lester, and Dennis A Dougherty. 2014. 'Selective ligand behaviors provide new insights into agonist activation of nicotinic acetylcholine receptors', *ACS chemical biology*, 9: 1153-59.
- Marsal, J., G. Tigyí, and R. Miledi. 1995. 'Incorporation of acetylcholine receptors and Cl⁻ channels in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 5224-8.
- Marshall, J., S. D. Buckingham, R. Shingai, G. G. Lunt, M. W. Goosey, M. G. Darlison, D. B. Sattelle, and E. A. Barnard. 1990. 'Sequence and functional expression of a single alpha subunit of an insect nicotinic acetylcholine receptor', *The EMBO Journal*, 9: 4391-98.
- Matsuda, K., S. D. Buckingham, D. Kleier, J. J. Rauh, M. Grauso, and D. B. Sattelle. 2001. 'Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors', *Trends Pharmacol Sci*, 22: 573-80.
- McCormack, Thomas, Robert M Petrovich, Kelly A Mercier, Eugene F DeRose, Matthew J Cuneo, Jason Williams, Katina L Johnson, Patricia W Lamb, Robert E London, and Jerrel L Yakel. 2010. 'Identification and functional characterization of a novel acetylcholine-binding protein from the marine annelid *Capitella teleta*', *Biochemistry*, 49: 2279-87.
- Mechai, S., G. Margos, E. J. Feil, L. R. Lindsay, P. Michel, S. O. Kotchi, and N. H. Ogden. 2018. 'Evidence for an effect of landscape connectivity on *Borrelia burgdorferi* sensu stricto dispersion in a zone of range expansion', *Ticks Tick Borne Dis*, 9: 1407-15.
- Medlock, J. M., K. M. Hansford, A. Bormane, M. Derdakova, A. Estrada-Pena, J. C. George, I. Golovljova, T. G. Jaenson, J. K. Jensen, P. M. Jensen, M. Kazimirova, J. A. Oteo, A. Papa, K. Pfister, O. Plantard, S. E. Randolph, A. Rizzoli, M. M. Santos-Silva, H. Sprong, L. Vial, G. Hendrickx, H. Zeller, and W. Van Bortel.

Références

2013. 'Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe', *Parasit Vectors*, 6: 1.
- Mekonnen, Sileshi, NR Bryson, LJ Fourie, RJ Peter, Arthur M Spickett, RJ Taylor, T Strydom, and Ivan Gerard Horak. 2002. 'Acaricide resistance profiles of single-and multi-host ticks from communal and commercial farming areas in the Eastern Cape and North-West Provinces of South Africa'.
- Meng, X., Y. Zhang, B. Guo, H. Sun, C. Liu, and Z. Liu. 2015b. 'Identification of key amino acid differences contributing to neonicotinoid sensitivity between two nAChR alpha subunits from *Pardosa pseudoannulata*', *Neurosci Lett*, 584: 123-8.
- Meng, Xiangkun, Yixi Zhang, Haibo Bao, and Zewen Liu. 2015a. 'Sequence Analysis of Insecticide Action and Detoxification-Related Genes in the Insect Pest Natural Enemy *Pardosa pseudoannulata*', *PLoS One*, 10: e0125242-e42.
- Michelitsch, A., K. Wernike, C. Klaus, G. Dobler, and M. Beer. 2019. 'Exploring the Reservoir Hosts of Tick-Borne Encephalitis Virus', *Viruses*, 11.
- Middleton, Richard E, and Jonathan B Cohen. 1991. 'Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor:[3H] nicotine as an agonist photoaffinity label', *Biochemistry*, 30: 6987-97.
- Miledi, R., Z. Dueñas, A. Martinez-Torres, C. H. Kawas, and F. Eusebi. 2004. 'Microtransplantation of functional receptors and channels from the Alzheimer's brain to frog oocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 1760-63.
- Miledi, R., F. Eusebi, A. Martinez-Torres, E. Palma, and F. Trettel. 2002. 'Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection of human brain membranes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 13238-42.
- Miledi, R., E. Palma, and F. Eusebi. 2006. 'Microtransplantation of neurotransmitter receptors from cells to *Xenopus* oocyte membranes: new procedure for ion channel studies', *Methods Mol Biol*, 322: 347-55.
- Miller, RJ, GC Almazán, OM Estrada, RB Davey, JE George, and VZ García. 2008. 'A survey for fipronil-and-ivermectin-resistant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* collected in northern Mexico and the options for the management of acaricide-resistant ticks with pesticides', *VI Seminario Internacional de Parasitología. Impacto de las enfermedades parasitarias sobre la ganadería globalizada. INIFAP-INFARVET-AMPAVE-CNGUV. Veracruz, México*.
- Milne, A. 1949. 'The ecology of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. Host relationships of the tick: Part 2. Observations on hill and moorland grazings in northern England', *Parasitology*, 39: 173-97.
- Mishina, M., T. Takai, K. Imoto, M. Noda, T. Takahashi, S. Numa, C. Methfessel, and B. Sakmann. 1986. 'Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor', *Nature*, 321: 406-11.
- Mishina, Masayoshi, Takamasa Tobimatsu, Keiji Imoto, Ken-ichi Tanaka, Yoshihiko Fujita, Kazuhiko Fukuda, Masaaki Kurasaki, Hideo Takahashi, Yuuki Morimoto, and Tadaaki Hirose. 1985. 'Location of functional regions of acetylcholine receptor α -subunit by site-directed mutagenesis', *Nature*, 313: 364-69.
- Mlera, L., and M. E. Bloom. 2018. 'The Role of Mammalian Reservoir Hosts in Tick-Borne Flavivirus Biology', *Front Cell Infect Microbiol*, 8: 298.
- Möller, S., M. D. Croning, and R. Apweiler. 2001. 'Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions', *Bioinformatics*, 17: 646-53.

Références

- Mongan, Nigel P, Howard A Baylis, Charlotte Adcock, Graham R Smith, MS Sansom, and David B Sattelle. 1998. 'An extensive and diverse gene family of nicotinic acetylcholine receptor alpha subunits in *Caenorhabditis elegans*', *Receptors & channels*, 6: 213-28.
- Mori, Kazuki, Takashi Okumoto, Nobuyuki Kawahara, and Yoshihisa Ozoe. 2002. 'Interaction of dinotefuran and its analogues with nicotinic acetylcholine receptors of cockroach nerve cords', *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 58: 190-96.
- Moroni, Mirko, Ruud Zwart, Emanuele Sher, Bruce K. Cassels, and Isabel Bermudez. 2006. ' $\alpha_4\beta_2$ Nicotinic Receptors with High and Low Acetylcholine Sensitivity: Pharmacology, Stoichiometry, and Sensitivity to Long-Term Exposure to Nicotine', *Molecular Pharmacology*, 70: 755-68.
- Murenzi, E., A. C. Toltin, S. B. Symington, M. M. Morgan, and J. M. Clark. 2017. 'Evaluation of microtransplantation of rat brain neurolemma into *Xenopus laevis* oocytes as a technique to study the effect of neurotoxicants on endogenous voltage-sensitive ion channels', *Neurotoxicology*, 60: 260-73.
- Nakagawa, Tatsuro, and Kazushige Touhara. 2013. 'Functional assays for insect olfactory receptors in *Xenopus* oocytes.' in, *Pheromone signaling* (Springer).
- Nauen, R., P. Jeschke, R. Velten, M. E. Beck, U. Ebbinghaus-Kintscher, W. Thielert, K. Wolfel, M. Haas, K. Kunz, and G. Raupach. 2015. 'Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide', *Pest Manag Sci*, 71: 850-62.
- Nauen, Ralf, Ulrich Ebbinghaus, and Klaus Tietjen. 1999. 'Ligands of the nicotinic acetylcholine receptor as insecticides', *Pesticide Science*, 55: 608-10.
- Nauen, Ralf, Peter Jeschke, Robert Velten, Michael E Beck, Ulrich Ebbinghaus-Kintscher, Wolfgang Thielert, Katharina Wölfel, Matthias Haas, Klaus Kunz, and Georg Raupach. 2015. 'Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide', *Pest Management Science*, 71: 850-62.
- Nava, Santiago, Alberto A Guglielmono, and Atilio J Mangold. 2009. 'An overview of systematics and evolution of ticks', *Front Biosci*, 14: 2857-77.
- Nchu, F., S. R. Magano, and J. N. Eloff. 2012. 'In vitro anti-tick properties of the essential oil of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) on *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae)', *Onderstepoort J Vet Res*, 79: E1-5.
- Nchu, F., S. R. Magano, and J. N. Eloff. 2016. 'Repellent activities of dichloromethane extract of *Allium sativum* (garlic) (Liliaceae) against *Hyalomma rufipes* (Acari)', *J S Afr Vet Assoc*, 87: e1-e5.
- Neher, Erwin, Bert Sakmann, and Joe Henry Steinbach. 1978. 'The extracellular patch clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes', *Pflügers Archiv*, 375: 219-28.
- Nelson, Mark E, Alexander Kuryatov, Catherine H Choi, Yan Zhou, and Jon Lindstrom. 2003. 'Alternate stoichiometries of $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptors', *Molecular Pharmacology*, 63: 332-41.
- Ng, Herman J, Edward R Whittemore, Minhtam B Tran, Derk J Hogenkamp, Ron S Broide, Timothy B Johnstone, Lijun Zheng, Karen E Stevens, and Kelvin W Gee. 2007. 'Nootropic α_7 nicotinic receptor allosteric modulator derived from GABAA receptor modulators', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 8059-64.
- Nicholson, William L., Daniel E. Sonenshine, Bruce H. Noden, and Richard N. Brown. 2019. 'Chapter 27 - Ticks (Ixodida).' in Gary R. Mullen and Lance A. Durden (eds.), *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)* (Academic Press).
- Nilsson, Kenneth, Olle Lindquist, Ai Jie Liu, Thomas GT Jaenson, Göran Friman, and Carl Pålhlson. 1999. '*Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden', *Journal of clinical microbiology*, 37: 400-03.

Références

- Nishimura, Keiichiro, Masahiro Tanaka, Kazuko Iwaya, and Shinzo Kagabu. 1998. 'Relationship between insecticidal and nerve-excitatory activities of imidacloprid and its alkylated congeners at the imidazolidine NH site', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 62: 172-78.
- Nishiwaki, Hisashi, Yoshiaki Nakagawa, Morihiko Kuwamura, Kazuyuki Sato, Miki Akamatsu, Kazuhiko Matsuda, Koichiro Komai, and Hisashi Miyagawa. 2003. 'Correlations of the electrophysiological activity of neonicotinoids with their binding and insecticidal activities', *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 59: 1023-30.
- Noda, Masaharu, Hideo Takahashi, Tsutomu Tanabe, Mitsuyoshi Toyosato, Sho Kikuyotani, Yasuji Furutani, Tadaaki Hirose, Hideaki Takashima, Seiichi Inayama, Takashi Miyata, and Shosaku Numa. 1983. 'Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits', *Nature*, 302: 528-32.
- Norris, Edmund J, Jacob B Johnson, Aaron D Gross, Lyric C Bartholomay, and Joel R Coats. 2018. 'Plant essential oils enhance diverse pyrethroids against multiple strains of mosquitoes and inhibit detoxification enzyme processes', *Insects*, 9: 132.
- Norris, EJ, AD Gross, LC Bartholomay, and JR Coats. 2019. 'Plant essential oils synergize various pyrethroid insecticides and antagonize malathion in Aedes aegypti', *Medical and Veterinary Entomology*, 33: 453-66.
- Nosek, J, and W Sixl. 1972. 'Central-European ticks (Ixodoidea)', *Mitt Abt Zool Landesmus Joanneum*, 1: 480Pomerantzev.
- Obenchain, Frederick D, and Rachel Galun. 1982. *Physiology of ticks: current themes in tropical science* (Elsevier).
- Oliver, Jonathan D, Geoffrey E Lynn, Nicole Y Burkhardt, Lisa D Price, Curtis M Nelson, Timothy J Kurtti, and Ulrike G Munderloh. 2016. 'Infection of immature Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) by membrane feeding', *Journal of Medical Entomology*, 53: 409-15.
- Oliver Jr, James H. 1989. 'Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida)', *Annual review of Ecology and Systematics*, 20: 397-430.
- Olsen, Jeppe A, Thomas Balle, Michael Gajhede, Philip K Ahring, and Jette S Kastrop. 2014. 'Molecular recognition of the neurotransmitter acetylcholine by an acetylcholine binding protein reveals determinants of binding to nicotinic acetylcholine receptors', *PLoS One*, 9: e91232.
- Olsen, Jeppe A, Jette S Kastrop, Dan Peters, Michael Gajhede, Thomas Balle, and Philip K Ahring. 2013. 'Two distinct allosteric binding sites at $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptors revealed by NS206 and NS9283 give unique insights to binding activity-associated linkage at Cys-loop receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 288: 35997-6006.
- Osborne, Richard H. 1996. 'Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors', *Pharmacology & therapeutics*, 69: 117-42.
- Pages, F., H. Dautel, G. Duvallet, O. Kahl, L. de Gentile, and N. Boulanger. 2014. 'Tick repellents for human use: prevention of tick bites and tick-borne diseases', *Vector Borne Zoonotic Dis*, 14: 85-93.
- Palladino, Michael J, Liam P Keegan, Mary A O'connell, and Robert A Reenan. 2000. 'A-to-I pre-mRNA editing in Drosophila is primarily involved in adult nervous system function and integrity', *Cell*, 102: 437-49.
- Palma, E, L Maggi, R Miledi, and F Eusebi. 1998. 'Effects of Zn²⁺ on wild and mutant neuronal α_7 nicotinic receptors', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 10246-50.
- Palma, Eleonora, Laura Maggi, Benedetta Barabino, Fabrizio Eusebi, and Marco Ballivet. 1999. 'Nicotinic Acetylcholine Receptors Assembled from the α_7 and β_3 Subunits', *Journal of Biological Chemistry*, 274: 18335-40.

Références

- Palma, Eleonora, Davide Ragozzino, Silvia Di Angelantonio, Addolorata Mascia, Francesca Maiolino, Mario Manfredi, Giampaolo Cantore, Vincenzo Esposito, Giancarlo Di Gennaro, and Pierpaolo Quarato. 2007. 'The antiepileptic drug levetiracetam stabilizes the human epileptic GABAA receptors upon repetitive activation', *Epilepsia*, 48: 1842-49.
- Palma, Eleonora, Flavia Trettel, Sergio Fucile, Massimiliano Renzi, Ricardo Miledi, and Fabrizio Eusebi. 2003. 'Microtransplantation of membranes from cultured cells to *Xenopus* oocytes: a method to study neurotransmitter receptors embedded in native lipids', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 2896-900.
- Pålsson, Katinka, Thomas G. T. Jaenson, Peter Bäckström, and Anna-Karin Borg-Karlson. 2008. 'Tick Repellent Substances in the Essential Oil of *Tanacetum vulgare*', *Journal of Medical Entomology*, 45: 88-93.
- Papke, Roger L, Paul R Sanberg, and R Douglas Shytle. 2001. 'Analysis of mecamylamine stereoisomers on human nicotinic receptor subtypes', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297: 646-56.
- Papke, Roger L. 2014. 'Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors', *Biochemical Pharmacology*, 89: 1-11.
- Parola, Philippe, and Didier Raoult. 2001. 'Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat', *Clinical infectious diseases*, 32: 897-928.
- Perret, J. L., P. M. Guerin, P. A. Diehl, M. Vlimant, and L. Gern. 2003. 'Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*', *J Exp Biol*, 206: 1809-15.
- Petney, Trevor N, Miriam P Pfäffle, and Jasmin D Skuballa. 2012. 'An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany', *Systematic and Applied Acarology*, 17: 115-70.
- Petney, Trevor N., Richard G. Robbins, Alberto A. Guglielmone, Dmitry A. Apanaskevich, Agustín Estrada-Peña, Ivan G. Horak, and Renfu Shao. 2011. 'A Look at the World of Ticks.' in Heinz Mehlhorn (ed.), *Progress in Parasitology* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Pfäffle, M., T. Petney, J. Skuballa, and H. Taraschewski. 2011. 'Comparative population dynamics of a generalist (*Ixodes ricinus*) and specialist tick (*I. hexagonus*) species from European hedgehogs', *Experimental and Applied Acarology*, 54: 151-64.
- Pfäffle, Miriam, Nina Littwin, Senta V. Muders, and Trevor N. Petney. 2013. 'The ecology of tick-borne diseases', *Int J Parasitol*, 43: 1059-77.
- Pintore, M. D., L. Ceballos, B. Iulini, L. Tomassone, A. Pautasso, D. Corbellini, F. Rizzo, M. L. Mandola, M. Bardelli, S. Peletto, P. L. Acutis, A. Mannelli, and C. Casalone. 2015. 'Detection of Invasive *Borrelia burgdorferi* Strains in North-Eastern Piedmont, Italy', *Zoonoses and public health*, 62: 365-74.
- Pisa, L. W., V. Amaral-Rogers, L. P. Belzunces, J. M. Bonmatin, C. A. Downs, D. Goulson, D. P. Kreuzweiser, C. Krupke, M. Liess, M. McField, C. A. Morrissey, D. A. Noome, J. Settele, N. Simon-Delso, J. D. Stark, J. P. Van der Sluijs, H. Van Dyck, and M. Wiemers. 2015. 'Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates', *Environmental Science and Pollution Research*, 22: 68-102.
- Platonov, Alexander E, Ludmila S Karan, Nadezhda M Kolyasnikova, Natalya A Makhneva, Marina G Toporkova, Victor V Maleev, Durland Fish, and Peter J Krause. 2011. 'Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia', *Emerging infectious diseases*, 17: 1816.
- Poinar, George, and Alex E. Brown. 2003. 'A new genus of hard ticks in Cretaceous Burmese amber (Acari: Ixodida: Ixodidae)', *Systematic Parasitology*, 54: 199-205.

Références

- Pospelova-Shtrom, MV. 1969. 'On the system of classification of ticks of the family Argasidae', *Acarologia*, 11: 1-22.
- Prevot, Pierre-Paul, Benoit Adam, Karim Zouaoui Boudjeltia, Michel Brossard, Laurence Lins, Philippe Cauchie, Robert Brasseur, Michel Vanhaeverbeek, Luc Vanhamme, and Edmond Godfroid. 2006. 'Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*', *Journal of Biological Chemistry*, 281: 26361-69.
- Prullage, JB, WG Cawthorne, LP Le Hir De Fallois, and PR Timmons. 2011. 'Synergy between fipronil and amitraz in a *Rhipicephalus sanguineus* tick residual contact test', *Experimental and Applied Acarology*, 54: 173-76.
- Prullage, Joseph B, J Mathews Pound, and Shirlee M Meola. 1992. 'Synganglial morphology and neurosecretory centers of adult *Amblyomma americanum* (L.)(Acari: Ixodidae)', *Journal of Medical Entomology*, 29: 1023-34.
- Przygodzka, M., E. Mikulak, T. Chmielewski, and A. Gliniewicz. 2019. 'Repellents as a major element in the context of prevention of tick-borne diseases', *Przegl Epidemiol*, 73: 269-80.
- Puinean, Alin M, Stuart J Lansdell, Toby Collins, Pablo Bielza, and Neil S Millar. 2013. 'A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*', *Journal of neurochemistry*, 124: 590-601.
- Ramsey, I Scott, Markus Delling, and David E Clapham. 2006. 'An introduction to TRP channels', *Annu. Rev. Physiol.*, 68: 619-47.
- Randolph, S. E. 2004. 'Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors', *Parasitology*, 129: S37-S65.
- Randolph, Sarah E, Loreta Asokliene, Tatjana Avsic-Zupanc, Antra Bormane, Caroline Burri, Lise Gern, Irina Golovljova, Zdenek Hubalek, Natasa Knap, and Maceij Kondrusik. 2008. 'Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather', *Parasites & vectors*, 1: 1-18.
- Rauter, Carolin, and Thomas Hartung. 2005. 'Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe: a Metaanalysis', *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7203-16.
- Raymond-Delpech, Valérie, Kazuhiko Matsuda, Benedict M. Sattelle, James J. Rauh, and David B. Sattelle. 2005. 'Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides', *Invertebrate Neuroscience*, 5: 119-33.
- Reyes-Ruiz, J. M., A. Limon, M. J. Korn, P. A. Nakamura, N. J. Shirkey, J. K. Wong, and R. Miledi. 2013. 'Profiling neurotransmitter receptor expression in the *Amblyomma mexicanum* brain', *Neurosci Lett*, 538: 32-7.
- Ribeiro, José MC, and Thomas N Mather. 1998. '*Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase', *Experimental Parasitology*, 89: 213-21.
- Richter, Dania, Franz-Rainer Matuschka, Andrew Spielman, and L. Mahadevan. 2013. 'How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280: 20131758.
- Rizzoli, ANNAPAOLA, HEIDI CHRISTINE Hauffe, GIOVANNA Carpi, GI Vourc'h, M Neteler, and R Rosa. 2011. 'Lyme borreliosis in Europe', *Eurosurveillance*, 16: 19906.
- Rocher, A, and N Marchand-Geneste. 2008. 'Homology modelling of the *Apis mellifera* nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) and docking of imidacloprid and fipronil insecticides and their metabolites', *SAR and QSAR in Environmental Research*, 19: 245-61.

Références

- Rodriguez, A., H. Zhang, J. Klaminder, T. Brodin, and M. Andersson. 2017. 'ToxId: an efficient algorithm to solve occlusions when tracking multiple animals', *Sci Rep*, 7: 14774.
- Rodriguez, Alvaro, Hanqing Zhang, Jonatan Klaminder, Tomas Brodin, Patrik L. Andersson, and Magnus Andersson. 2018. 'ToxTrac: A fast and robust software for tracking organisms', *Methods in Ecology and Evolution*, 9: 460-64.
- Role, L. W. 1992. 'Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels', *Curr Opin Neurobiol*, 2: 254-62.
- Rudzinska, Maria A, Andrew Spielman, Sondra Lewengrub, Joseph Piesman, and Stephen Karakashian. 1982. 'Penetration of the peritrophic membrane of the tick by *Babesia microti*', *Cell and tissue research*, 221: 471-81.
- Saelao, Perot, Paul V Hickner, Kylie G Bendele, and Adalberto A Pérez de León. 2021. 'Phylogenomics of Tick Inward Rectifier Potassium Channels and Their Potential as Targets to Innovate Control Technologies', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11: 157.
- Sahdeo, Sunil, Tanya Wallace, Ryoko Hirakawa, Frederic Knoflach, Daniel Bertrand, Hans Maag, Dinah Misner, Geoffrey C Tombaugh, Luca Santarelli, and Ken Brameld. 2014. 'Characterization of RO5126946, a Novel $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor–Positive Allosteric Modulator', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 350: 455-68.
- Salgado, V. L. 2016. 'Antagonist pharmacology of desensitizing and non-desensitizing nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons', *NeuroToxicology*, 56: 188-95.
- Salgado, Vincent L., and Raimund Saar. 2004. 'Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons', *Journal of Insect Physiology*, 50: 867-79.
- Salvaterra, P. M., and H. R. Mahler. 1976. 'Nicotinic acetylcholine receptor from rat brain. Solubilization, partial purification, and characterization', *Journal of Biological Chemistry*, 251: 6327-34.
- Samochocki, Marek, Anja Höffle, Andreas Fehrenbacher, Ruth Jostock, Jürgen Ludwig, Claudia Christner, Martin Radina, Marion Zerlin, Christoph Ullmer, and Edna FR Pereira. 2003. 'Galantamine is an allosterically potentiating ligand of neuronal nicotinic but not of muscarinic acetylcholine receptors', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 305: 1024-36.
- Santé-Publique-France. 2021. 'Le virus West Nile et l'encéphalite à tique rejoignent la liste des maladies à déclaration obligatoire'. <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2021/le-virus-west-nile-et-l-encephalite-a-tique-rejoignent-la-liste-des-maladies-a-declaration-obligatoire>.
- Santé, Ministère des affaires sociales et de la. 2016. "Plan national de lutte contre la maladie de Lyme et les maladies transmissibles par les tiques 2016." In.
- Sauer, J. R., R. C. Essenberg, and A. S. Bowman. 2000. 'Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion', *Journal of Insect Physiology*, 46: 1069-78.
- Sawruk, Erich, P Schloss, H Betz, and B Schmitt. 1990. 'Heterogeneity of *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptors: SAD, a novel developmentally regulated alpha-subunit', *The EMBO Journal*, 9: 2671-77.
- Schloss, P., H. Betz, C. Schroder, and E. D. Gundelfinger. 1991. 'Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in *Drosophila*: antibodies against an alpha-like and a non-alpha-subunit recognize the same high-affinity alpha-bungarotoxin binding complex', *J Neurochem*, 57: 1556-62.

Références

- Schorn, Sabine, Kurt Pfister, Holger Reulen, Monia Mahling, and Cornelia Silaghi. 2011. 'Occurrence of Babesia spp., Rickettsia spp. and Bartonella spp. in Ixodes ricinus in Bavarian public parks, Germany', *Parasites & vectors*, 4: 1-9.
- Schubert, Sara L, and Vanessa R Melanson. 2019. 'Prevalence of Lyme Disease Attributable to Military Service at the USMA, West Point NY: FY2016–2018', *Military Medicine*, 185: e28-e34.
- Seeburg, Peter H. 2002. 'A-to-I editing: new and old sites, functions and speculations', *Neuron*, 35: 17-20.
- Selzer, Paul M. 2018. *Ectoparasites: drug discovery against moving targets* (John Wiley & Sons).
- Semenza, J. C., and B. Menne. 2009. 'Climate change and infectious diseases in Europe', *Lancet Infect Dis*, 9: 365-75.
- Semmler, M., F. Abdel-Ghaffar, K. A. Al-Rasheid, and H. Mehlhorn. 2011. 'Comparison of the tick repellent efficacy of chemical and biological products originating from Europe and the USA', *Parasitol Res*, 108: 899-904.
- Septfons, A., T. Goronflot, B. Jaulhac, V. Roussel, S. De Martino, S. Guerreiro, T. Launay, L. Fournier, H. De Valk, J. Figoni, T. Blanchon, and E. Couturier. 2019. 'Epidemiology of Lyme borreliosis through two surveillance systems: the national Sentinelles GP network and the national hospital discharge database, France, 2005 to 2016', *Euro Surveill*, 24.
- Sgard, F, SP Fraser, MJ Katkowska, MBA Djamgoz, SJ Dunbar, and JD Windass. 1998. 'Cloning and functional characterisation of two novel nicotinic acetylcholine receptor α subunits from the insect pest *Myzus persicae*', *Journal of neurochemistry*, 71: 903-12.
- Shahsavari, Azadeh, Michael Gajhede, Jette S Kastrop, and Thomas Balle. 2016. 'Structural studies of nicotinic acetylcholine receptors: Using acetylcholine-binding protein as a structural surrogate', *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 118: 399-407.
- Shan, Tisheng, Huihui Zhang, Chengyu Chen, Anqi Chen, Xueyan Shi, and Xiwu Gao. 2020. 'Low expression levels of nicotinic acetylcholine receptor subunits $B\alpha 1$ and $B\beta 1$ are associated with imidacloprid resistance in *Bradysia odoriphaga*', *Pest Management Science*, 76: 3038-45.
- Shao, Ya-Ming, Ke Dong, and Chuan-Xi Zhang. 2007. 'The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*', *BMC genomics*, 8: 1-10.
- Shimada, Shota, Masaki Kamiya, Sho Shigetou, Kakeru Tomiyama, Yuma Komori, Leo Magara, Makoto Ihara, and Kazuhiko Matsuda. 2020. 'The mechanism of loop C-neonicotinoid interactions at insect nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 1$ subunit predicts resistance emergence in pests', *Scientific Reports*, 10: 1-8.
- Shimomura, M., M. Yokota, K. Matsuda, D. B. Sattelle, and K. Komai. 2004. 'Roles of loop C and the loop B-C interval of the nicotinic receptor alpha subunit in its selective interactions with imidacloprid in insects', *Neurosci Lett*, 363: 195-8.
- Shimomura, Masaru, Hiroshi Okuda, Kazuhiko Matsuda, Koichiro Komai, Miki Akamatsu, and David B Sattelle. 2002. 'Effects of mutations of a glutamine residue in loop D of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor on agonist profiles for neonicotinoid insecticides and related ligands', *British Journal of Pharmacology*, 137: 162-69.
- Shimomura, Masaru, Hitoshi Satoh, Maiko Yokota, Makoto Ihara, Kazuhiko Matsuda, and David B. Sattelle. 2005. 'Insect-vertebrate chimeric nicotinic acetylcholine receptors identify a region, loop B to the N-terminus of the *Drosophila* $D\alpha 2$ subunit, which contributes to neonicotinoid sensitivity', *Neuroscience Letters*, 385: 168-72.

Références

- Shimomura, Masaru, Maiko Yokota, Makoto Ihara, Miki Akamatsu, David B. Sattelle, and Kazuhiko Matsuda. 2006. 'Role in the Selectivity of Neonicotinoids of Insect-Specific Basic Residues in Loop D of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist Binding Site', *Molecular Pharmacology*, 70: 1255-63.
- Shimomura, Masaru, Maiko Yokota, Masako Okumura, Kazuhiko Matsuda, Miki Akamatsu, David B. Sattelle, and Koichiro Komai. 2003. 'Combinatorial mutations in loops D and F strongly influence responses of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor to imidacloprid', *Brain Research*, 991: 71-77.
- Silaghi, Cornelia, Jérémie Gilles, Michael Höhle, Volker Fingerle, Frank Thomas Just, and Kurt Pfister. 2008. 'Anaplasma phagocytophilum infection in Ixodes ricinus, Bavaria, Germany', *Emerging infectious diseases*, 14: 972.
- Šimo, Ladislav, Mirko Slovák, Yoonseong Park, and Dušan Žitňan. 2009. 'Identification of a complex peptidergic neuroendocrine network in the hard tick, Rhipicephalus appendiculatus', *Cell and tissue research*, 335: 639-55.
- Sine, Steven M, and Andrew G Engel. 2006. 'Recent advances in Cys-loop receptor structure and function', *Nature*, 440: 448-55.
- Sine, Steven M. 2002. 'The nicotinic receptor ligand binding domain', *Journal of Neurobiology*, 53: 431-46.
- Siński, Edward, Anna Bajer, Renata Welc, Agnieszka Pawełczyk, Maria Ogrzewalska, and Jerzy M Behnke. 2006. 'Babesia microti: prevalence in wild rodents and Ixodes ricinus ticks from the Mazury Lakes District of North-Eastern Poland', *International Journal of Medical Microbiology*, 296: 137-43.
- Skuballa, Jasmin, T. Petney, M. Pfäffle, and H. Taraschewski. 2010. 'Molecular Detection of Anaplasma phagocytophilum in the European Hedgehog (Erinaceus europaeus) and its Ticks', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10: 1055-57.
- Skuballa, Jasmin, Trevor Petney, Miriam Pfäffle, Rainer Oehme, Kathrin Hartelt, Volker Fingerle, Peter Kimmig, and Horst Taraschewski. 2012. 'Occurrence of different Borrelia burgdorferi sensu lato genospecies including B. afzelii, B. bavariensis, and B. spielmanii in hedgehogs (Erinaceus spp.) in Europe', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3: 8-13.
- Smit, August B, Naweed I Syed, Dick Schaap, Jan van Minnen, Judith Klumperman, Karel S Kits, Hans Lodder, Roel C van der Schors, René van Elk, and Bertram Sorgedragter. 2001. 'A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission', *Nature*, 411: 261-68.
- Smithson, Peter A. 2002. "IPCC, 2001: climate change 2001: the scientific basis. Contribution of Working Group 1 to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, edited by JT Houghton, Y. Ding, DJ Griggs, M. Noguer, PJ van der Linden, X. Dai, K. Maskell and CA Johnson (eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York, USA, 2001. No. of pages: 881. Price£ 34.95, US 49.95, ISBN 0-521-01495-6 (paperback). £90.00, US 130.00, ISBN 0-521-80767-0 (hardback)." In.: Wiley Online Library.
- Sojka, Daniel, Zdeněk Franta, Martin Horn, Conor R Caffrey, Michael Mareš, and Petr Kopáček. 2013. 'New insights into the machinery of blood digestion by ticks', *Trends in Parasitology*, 29: 276-85.
- Sonenshine, DANIEL E, and RM Roe. 2014. 'Mouthparts and digestive system', *Biology of ticks*, 1: 122-62.
- Song, Feng, Zhiqi You, Xiangmei Yao, Jiagao Cheng, Zewen Liu, and Kejian Lin. 2009. 'Specific loops D, E and F of nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit may confer imidacloprid selectivity between Myzus persicae and its predatory enemy Pardosa pseudoannulata', *Insect biochemistry and molecular biology*, 39: 833-41.
- Soreq, Hermona, and Shlomo Seidman. 1992. '[14]Xenopus oocyte microinjection: From gene to protein.' in, *Methods in Enzymology* (Academic Press).

Références

- Soutar, Oliver, Freya Cohen, and Richard Wall. 2019. 'Essential oils as tick repellents on clothing', *Experimental and Applied Acarology*, 79: 209-19.
- Sparks, Thomas C, Gerald B Watson, Michael R Loso, Chaoxian Geng, Jon M Babcock, and James D Thomas. 2013. 'Sulfoxaflor and the sulfoximine insecticides: chemistry, mode of action and basis for efficacy on resistant insects', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 107: 1-7.
- Sparks, Thomas C., and Ralf Nauen. 2015. 'IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121: 122-28.
- Stachurski, Frédéric, and Renaud Lancelot. 2006. 'Footbath acaricide treatment to control cattle infestation by the tick *Amblyomma variegatum*', *Medical and Veterinary Entomology*, 20: 402-12.
- Stanek, G., V. Fingerle, K. P. Hunfeld, B. Jaulhac, R. Kaiser, A. Krause, W. Kristoferitsch, S. O'Connell, K. Ornstein, F. Strle, and J. Gray. 2011. 'Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe', *Clin Microbiol Infect*, 17: 69-79.
- Stanek, G., G. P. Wormser, J. Gray, and F. Strle. 2012. 'Lyme borreliosis', *Lancet*, 379: 461-73.
- Stanneck, D., and J. J. Fourie. 2013. 'Imidacloprid 10 % / flumethrin 4.5 % collars (Seresto®, Bayer) successfully prevent long-term transmission of *Ehrlichia canis* by infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs', *Parasitol Res*, 112 Suppl 1: 21-32.
- Staub, Daniel, Marianne Debrunner, Lorenz Amsler, and Robert Steffen. 2002. 'Effectiveness of a Repellent Containing DEET and EBAAP for Preventing Tick Bites', *Wilderness & Environmental Medicine*, 13: 12-20.
- Steen, N. A., S. C. Barker, and P. F. Alewood. 2006. 'Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): Pharmacological features and biological significance', *Toxicon*, 47: 1-20.
- Steere, A. C., S. E. Malawista, D. R. Snyderman, R. E. Shope, W. A. Andiman, M. R. Ross, and F. M. Steele. 1977. 'Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities', *Arthritis Rheum*, 20: 7-17.
- Stone, BF, MA Commins, and DH Kemp. 1983. 'Artificial feeding of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin', *Int J Parasitol*, 13: 447-54.
- Stuen, S., E. G. Granquist, and C. Silaghi. 2013a. 'Anaplasma phagocytophilum--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies', *Front Cell Infect Microbiol*, 3: 31.
- Stuen, Snorre, Erik Granquist, and Cornelia Silaghi. 2013b. 'Anaplasma phagocytophilum—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3.
- Stühmer, Walter. 1998. '[16] Electrophysiologic recordings from *Xenopus* oocytes.' in, *Methods in Enzymology* (Academic Press).
- Suchail, Séverine, David Guez, and Luc P. Belzunces. 2001. 'Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 2482-86.
- Šumilo, Dana, Antra Bormane, Loreta Asokliene, Veera Vasilenko, Irina Golovljova, Tatjana Avsic-Zupanc, Zdenek Hubalek, and Sarah E Randolph. 2008. 'Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in central and Eastern Europe', *Reviews in medical virology*, 18: 81-95.
- Swale, Daniel R, Baonan Sun, Fan Tong, and Jeffrey R Bloomquist. 2014. 'Neurotoxicity and mode of action of N, N-diethyl-meta-toluamide (DEET)', *PLoS One*, 9: e103713.

Références

- Swanson, Stephen J, David Neitzel, Kurt D Reed, and Edward A Belongia. 2006. 'Coinfections acquired from Ixodes ticks', *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 708-27.
- Swope, S. L., S. J. Moss, L. A. Raymond, and R. L. Haganir. 1999. 'Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation', *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 33: 49-78.
- Szabadics, J., and L. Erdélyi. 2000. 'Pre- and postsynaptic effects of eugenol and related compounds on *Helix pomatia* L. neurons', *Acta Biologica Hungarica*, 51: 265-73.
- Szlendak, Ewa, and James H. Oliver Jr. 1992. 'Anatomy of synganglia, including their neurosecretory regions, in unfed, virgin female *Ixodes scapularis* say (Acari: Ixodidae)', *Journal of Morphology*, 213: 349-64.
- Tabari, M. A., M. R. Youssefi, F. Maggi, and G. Benelli. 2017. 'Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae)', *Vet Parasitol*, 245: 86-91.
- Taillebois, E., A. Cartereau, A. K. Jones, and S. H. Thany. 2018. 'Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies', *Pestic Biochem Physiol*, 151: 59-66.
- Taillebois, Emiliane, Abdelhamid Beloula, Sophie Quinchart, Stéphanie Jaubert-Possamai, Antoine Daguin, Denis Servent, Denis Tagu, Steeve H. Thany, and Hélène Tricoire-Leignel. 2014. 'Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon pisum*', *PLoS One*, 9: e96669.
- Taillebois, Emiliane, Alison Cartereau, Jérôme Graton, Jean-Yves Le Questel, Jacques Lebreton, Monique Mathé-Allainmat, and Steeve H. Thany. 2020. 'Synergic effect of a quinuclidine benzamide complexed with borane, the LMA10233, in combination with seven pesticides', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 168: 104633.
- Talleklint, L., and T. G. Jaenson. 1994. 'Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden', *J Med Entomol*, 31: 880-6.
- Taly, Antoine, Pierre-Jean Corringer, Denis Guedin, Pierre Lestage, and Jean-Pierre Changeux. 2009. 'Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system', *Nature Reviews Drug Discovery*, 8: 733-50.
- Tamamizu, S, Y-H Lee, B Hung, MG McNamee, and JA Lasalde-Dominicci. 1999. 'Alteration in ion channel function of mouse nicotinic acetylcholine receptor by mutations in the M4 transmembrane domain', *The Journal of membrane biology*, 170: 157-64.
- Tan, Jianguo, James J. Galligan, and Robert M. Hollingworth. 2007. 'Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons', *Neurotoxicology*, 28: 829-42.
- Tarnowski, Betty I, and Lewis B Coons. 1989. 'Ultrastructure of the midgut and blood meal digestion in the adult tick *Dermacentor variabilis*', *Experimental & applied acarology*, 6: 263-89.
- Thany, S. H., R. Courjaret, and B. Lapied. 2008. 'Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical alpha-bungarotoxin-insensitive nAChR2', *Neurosci Lett*, 438: 317-21.
- Thany, Steeve H. 2009. 'Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion', *Neurotoxicology*, 30: 1045-52.
- Thany, Steeve H., Guy Lenaers, Valérie Raymond-Delpech, David B. Sattelle, and Bruno Lapied. 2007. 'Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors', *Trends in Pharmacological Sciences*, 28: 14-22.

Références

- Thorsell, W., A. Mikiver, and H. Tunon. 2006. 'Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L', *Phytomedicine*, 13: 132-4.
- Timmermann, Daniel B, Jens Halvard Grønlien, Kathy L Kohlhaas, Elsebet Ø Nielsen, Eva Dam, Tino D Jørgensen, Philip K Ahring, Dan Peters, Dorte Holst, and Jeppe K Chrsitensen. 2007. 'An allosteric modulator of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor possessing cognition-enhancing properties in vivo', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323: 294-307.
- Tomizawa M. , Ostuka H., Miyamoto T. , Eldefrawi M.E. , and Yamamoto I. 1995. 'Pharmacological characteristics of insect nicotinic acetylcholine receptor with its ion channel and the comparison of the effect of nicotinoids and neonicotinoids', *Journal of Pesticide Science*, 20: 57-64.
- Tomizawa, M., and J. E. Casida. 2003. 'Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors', *Annu Rev Entomol*, 48: 339-64.
- Tomizawa, Motohiro, and John E Casida. 2005. 'Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action', *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 247-68.
- Tomizawa, Motohiro, and John E Casida. 2011. "Neonicotinoid insecticides: highlights of a symposium on strategic molecular designs." In.: ACS Publications.
- Tomizawa, Motohiro, and John E. Casida. 2009. 'Molecular Recognition of Neonicotinoid Insecticides: The Determinants of Life or Death', *Accounts of Chemical Research*, 42: 260-69.
- Tong, Fan, and Jeffrey R Bloomquist. 2013. 'Plant essential oils affect the toxicities of carbaryl and permethrin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)', *Journal of Medical Entomology*, 50: 826-32.
- Torkkeli, Päivi H, Hongxia Liu, and Andrew S French. 2015. 'Transcriptome analysis of the central and peripheral nervous systems of the spider *Cupiennius salei* reveals multiple putative Cys-loop ligand gated ion channel subunits and an acetylcholine binding protein', *PLoS One*, 10: e0138068.
- Toshima, Kayoko, Makoto Ihara, Satoshi Kanaoka, Kiyoshi Tarumoto, Atsushi Yamada, David B. Sattelle, and Kazuhiko Matsuda. 2008. 'Potentiation and blocking actions of neonicotinoids on the response to acetylcholine of the neuronal $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor', *Journal of Pesticide Science*, advpub: 0803060024-24.
- Towers, Paula R, and David B Sattelle. 2002. 'A *Drosophila melanogaster* cell line (S2) facilitates post-genome functional analysis of receptors and ion channels', *Bioessays*, 24: 1066-73.
- Toyoshima, Chikashi, and Nigel Unwin. 1990. 'Three-dimensional structure of the acetylcholine receptor by cryoelectron microscopy and helical image reconstruction', *The Journal of cell biology*, 111: 2623-35.
- Tunón, H., W. Thorsell, A. Mikiver, and I. Malander. 2006. 'Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from *Artemisia abrotanum* and essential oil from flowers of *Dianthus caryophyllum*', *Fitoterapia*, 77: 257-61.
- Uilenberg, Gerrit. 2006. 'Babesia—a historical overview', *Veterinary Parasitology*, 138: 3-10.
- Unwin, Nigel. 2005. 'Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4Å Resolution', *Journal of Molecular Biology*, 346: 967-89.
- Unwin, Nigel, and Yoshinori Fujiyoshi. 2012. 'Gating movement of acetylcholine receptor caught by plunge-freezing', *Journal of Molecular Biology*, 422: 617-34.
- Vancová, Marie, Tomáš Bílý, Ladislav Šimo, Jan Touš, Petr Horodyský, Daniel Růžek, Adam Novobilský, Jiří Salát, Martin Strnad, Daniel E. Sonenshine, Libor Grubhoffer, and Jana Nebesářová. 2020. 'Three-

Références

- dimensional reconstruction of the feeding apparatus of the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae): a new insight into the mechanism of blood-feeding', *Scientific Reports*, 10: 165.
- Vial, Catherine, Jonathan A Roberts, and Richard J Evans. 2004. 'Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels', *Trends in Pharmacological Sciences*, 25: 487-93.
- Wada, Keiji, Marc Ballivet, Jim Boulter, John Connolly, Etsuko Wada, Evan S Deneris, Larry W Swanson, Steve Heinemann, and Jim Patrick. 1988. 'Functional expression of a new pharmacological subtype of brain nicotinic acetylcholine receptor', *Science*, 240: 330-34.
- Wang, Jingyi, and Jon Lindstrom. 2018. 'Orthosteric and allosteric potentiation of heteromeric neuronal nicotinic acetylcholine receptors', *British Journal of Pharmacology*, 175: 1805-21.
- Wang, Xin, Xiangkun Meng, Chuanjun Liu, Hongli Gao, Yixi Zhang, and Zewen Liu. 2015. 'Cys-loop ligand-gated ion channel gene discovery in the *Locusta migratoria manilensis* through the neuron transcriptome', *Gene*, 561: 276-82.
- Weltzin, Maegan M, Yanzhou Huang, and Marvin K Schulte. 2014. 'Allosteric modulation of $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptors by HEPES', *European journal of pharmacology*, 732: 159-68.
- WHO, World Health Organization. 2020. 'Vector-borne diseases'. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>.
- Wiesner, Petra, and Hartmut Kayser. 2000. 'Characterization of nicotinic acetylcholine receptors from the insects *Aphis craccivora*, *Myzus persicae*, and *Locusta migratoria* by radioligand binding assays: Relation to thiamethoxam action', *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 14: 221-30.
- Wilson, K. D., and D. M. Elston. 2018. 'What's eating you? Ixodes tick and related diseases, part 2: diagnosis and treatment of regional tick-borne diseases', *Cutis*, 101: 266;68;305.
- Wu, P., D. Ma, M. Pierzchala, J. Wu, L. C. Yang, X. Mai, X. Chang, and T. Schmidt-Glenewinkel. 2005. 'The *Drosophila* acetylcholine receptor subunit D α_5 is part of an α -bungarotoxin binding acetylcholine receptor', *J Biol Chem*, 280: 20987-94.
- Wustenber, D. G., and B. Grunewald. 2004. 'Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*', *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 190: 807-21.
- Wüstenberg, Daniel G., and Bernd Grunewald. 2004. 'Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*', *Journal of Comparative Physiology A*, 190: 807-21.
- Yixi, Z., Z. Liu, Z. Han, F. Song, X. Yao, Y. Shao, J. Li, and N. S. Millar. 2009. 'Functional co-expression of two insect nicotinic receptor subunits (N1 α_3 and N1 α_8) reveals the effects of a resistance-associated mutation (N1 α_3) on neonicotinoid insecticides', *J Neurochem*, 110: 1855-62.
- Young, Howard S, Leo G Herbette, and Victor Skita. 2003. ' α -bungarotoxin binding to acetylcholine receptor membranes studied by low angle X-ray diffraction', *Biophysical journal*, 85: 943-53.
- Zhang, Aiguo, Hartmut Kaiser, Peter Maienfisch, and John E Casida. 2000. 'Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor: Conserved Neonicotinoid Specificity of [³H] Imidacloprid Binding Site: Conserved Neonicotinoid Specificity of [³H] Imidacloprid Binding Site', *Journal of neurochemistry*, 75: 1294-303.
- Zhang, Nanjing, Motohiro Tomizawa, and John E. Casida. 2004. '*Drosophila* nicotinic receptors: evidence for imidacloprid insecticide and α -bungarotoxin binding to distinct sites', *Neuroscience Letters*, 371: 56-59.

Références

- Zhu, Z, Lise Gern, and André Aeschlimann. 1991. 'The peritrophic membrane of *Ixodes ricinus*', *Parasitology Research*, 77: 635-41.
- Zoli, Michele, Francesco Pistillo, and Cecilia Gotti. 2015. 'Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain', *Neuropharmacology*, 96: 302-11.
- Zoli, Michele, Susanna Pucci, Antonietta Vilella, and Cecilia Gotti. 2018. 'Neuronal and extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors', *Current neuropharmacology*, 16: 338-49.
- Zorloni, A., B. L. Penzhorn, and J. N. Eloff. 2010. 'Extracts of *Calpurnia aurea* leaves from southern Ethiopia attract and immobilise or kill ticks', *Vet Parasitol*, 168: 160-4.
- Zwart, R, G De Filippi, LM Broad, GI McPhie, KH Pearson, T Baldwinson, and E Sher. 2002. '5-Hydroxyindole potentiates human $\alpha 7$ nicotinic receptor-mediated responses and enhances acetylcholine-induced glutamate release in cerebellar slices', *Neuropharmacology*, 43: 374-84.

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Illustration schématique représentant la phylogénie des tiques à partir de l'embranchement des arthropodes jusqu'aux différents genres connus actuellement. | 11 |
| Figure 2 : Anatomie interne d'une tique femelle du genre <i>Ixodes</i> en train de se nourrir et d'être fécondée par un mâle | 18 |
| Figure 3 : Représentation de l'anatomie de la tique du genre <i>Ixodes</i> | 18 |
| Figure 4 : Représentation schématique du cycle de développement de la tique <i>Ixodes ricinus</i> et des différents modes de transmission des pathogènes entre les tiques et les hôtes mais également entre les tiques elles-mêmes..... | 20 |
| Figure 5 : Répartition de l'espèce <i>Ixodes ricinus</i> | 22 |
| Figure 6 : Historique de l'évolution des principales familles de pesticides, de l'antiquité à nos jours. | 34 |
| Figure 7 : Représentation des structures d'insecticides néonicotinoïdes classés en fonction des modifications présentes sur les structures, ainsi que la structure du sulfoxaflo et du flupyradifurone..... | 45 |
| Figure 8 : Structure des quatre superfamilles de récepteurs composants les LGICs. | 48 |
| Figure 9 : Représentation en ruban des sous-unités formant le récepteur $(\alpha)_2\beta_1\gamma\delta$ de la torpille. | 51 |
| Figure 10 : Représentation de la structure des sous-unités formant les récepteurs nicotiniques. | 52 |
| Figure 11 : Représentation (A) des anneaux chargés à l'intérieur du pore ionique ainsi que (B) du site de liaison à l'ACh à l'interface entre une sous-unité α (principale) et complémentaire (α ou β). | 54 |
| Figure 12 : Représentation en 3D de l'AChBP du mollusque <i>Lymnaea stagnalis</i> | 56 |
| Figure 13 : Illustration des différents états des nAChRs (fermé (A), ouvert (B), désensibilisé (C). | 58 |
| Figure 14 : Diversité des sous-unités de nAChRs présentes chez les vertébrés pouvant former des récepteurs hétéro- ou homomériques..... | 60 |
| Figure 15 : Illustration des mécanismes d'épissage alternatif, ainsi que l'exemple du gène α_4 | 71 |
| Figure 16 : Représentation des nAChRs sensibles et insensibles à l' α -Bgt. | 74 |
| Figure 17 : Représentation des différents stades de développement de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 91 |
| Figure 18 : Illustration de l'anatomie de la tique et de l'emplacement de son synganglion. | 91 |
| Figure 19 : Représentation schématisée de l'anatomie du synganglion de la tique et des nerfs périphériques et organes qui lui sont associés..... | 92 |
| Figure 20 : Illustration des étapes réalisées lors l'utilisation d'extraits membranaires pour effectuer leur microtransplantation en ovocyte de xénope..... | 98 |
| Figure 21 : Illustration du Xénope (A, <i>Xenopus laevis</i>) et des ovocytes utilisés pour les expériences d'électrophysiologie de double microélectrode en potentiel imposé (B et C). | 101 |
| Figure 22 : Représentation de la technique de double microélectrode en potentiel imposé (ou TEVC). . | 105 |
| Figure 23 : Description du dispositif expérimental pour l'étude du comportement d'évitement chez la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 112 |

Listes des figures et tableaux

| | |
|--|-----|
| Figure 24 : Schéma reprenant les étapes de caractérisation moléculaire puis de clonage des transcrits de nAChRs de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 114 |
| Figure 25 : Illustration des techniques de biologie moléculaire utilisées pour réaliser la caractérisation moléculaire des sous-unités de nAChRs de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 118 |
| Figure 26 : Représentation schématique de la technique de RACE PCR dans le but d'amplifier la partie 5' du transcrit à caractériser..... | 120 |
| Figure 27 : Représentation schématique de la technique de RACE PCR dans le but d'amplifier la partie 3' du transcrit à caractériser..... | 121 |
| Figure 28 : Etude des courants induits par l'ACh et la Nic dans des ovocytes microtransplantés avec des membranes provenant des synganglia de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 133 |
| Figure 29 : Etude des réponses induites suite à l'application de muscarine (Mus) sur les ovocytes microtransplantés avec des membranes provenant du synganglion de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 134 |
| Figure 30 : Etude des courants induits par l'ACh et la Nic en présence ou non d' α -Bgt dans des ovocytes microtransplantés avec des membranes provenant des synganglia de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 135 |
| Figure 31 : Marquage des nAChRs sensibles à l' α -bungarotoxine (α -Bgt) dans les extraits membranaires de synganglion de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 136 |
| Figure 32 : Effet de modulation du PNU-120596 (PNU) sur les courants induits par l'ACh et la Nic sur des ovocytes microtransplantés avec des membranes de synganglion (en absence d'atropine)..... | 137 |
| Figure 33 : Effet de modulation du PNU-120596 (PNU) sur les courants induits par l'ACh dans les ovocytes microtransplantés avec des membranes de synganglion (en présence d'atropine)..... | 138 |
| Figure 34 : Etude des courants induits par l'ACh et la Nic sur des ovocytes microtransplantés avec des membranes de synganglia de tique, et effet de l' α -Bgt sur leurs amplitudes..... | 139 |
| Figure 35 : Effet de modulation de la mécamylamine (Mec) et de la méthyllycaconitine (MLA) sur les courants induits par l'ACh (1 mM) en ovocyte de xénope microtransplantés avec des membranes de synganglion..... | 140 |
| Figure 36 : Effet de modulation de la mécamylamine (Mec) et de la méthyllycaconitine (MLA) sur les courants induits par la nicotine (Nic, 1 mM) en ovocyte de xénope microtransplantés avec des membranes de synganglion..... | 141 |
| Figure 37 : Etude des courants induits par plusieurs néonicotinoïdes (Clothianidine : CLT, Imidaclopride : IMI, Thiaméthoxame : TMX, Acétamipride : ACE) sur des ovocytes microtransplantés avec des membranes du synganglion de la tique..... | 143 |
| Figure 38 : Etude des courants induits par plusieurs agonistes comme l'ACh, la Nic, comparé aux réponses engendrées par deux pesticides : le DEET ainsi que le flupyradifurone (FLU), appliqués sur des ovocytes microtransplantés avec des membranes de synganglia..... | 145 |
| Figure 39 : Représentation de l'effet en prétraitement du DEET et du flupyradifurone (FLU) à 5 nM sur la réponse à l'ACh (1 mM) ou à la nicotine (1 mM)..... | 146 |
| Figure 40 : Effet répulsif du DEET quand il est appliqué à une concentration de 10% au centre de la plateforme..... | 158 |
| Figure 41 : Effet répulsif du DEET quand il est appliqué à une concentration de 20% au centre de la plateforme..... | 159 |

Listes des figures et tableaux

| | |
|---|-----|
| Figure 42 : Effet répulsif du flupyradifurone (FLU) quand il est appliqué à une concentration de 10% au centre de la plateforme. | 161 |
| Figure 43 : Effet répulsif du flupyradifurone (FLU) quand il est appliqué à une concentration de 20% au centre de la plateforme. | 162 |
| Figure 44 : Effet répulsif du mélange de DEET (10%) et de flupyradifurone (FLU, 10%) quand il est appliqué au centre de la plateforme. | 164 |
| Figure 45 : Illustration des amplifications des ORFs entières obtenues par PCR pour les sous-unités Iric α 1, Iric α 2, Iric α 5 et Iric α 6 de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 169 |
| Figure 46 : Aligment des séquences protéiques des sous-unités de nAChRs de la tique <i>Ixodes ricinus</i> obtenues par clonage. | 171 |
| Figure 47 : Étude des mutations présentes dans les séquences de la sous-unité nAChR des tiques, par rapport aux séquences d'autres arthropodes. | 172 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1 : Liste des différents pathogènes pour l'Homme pouvant être transmis par la tique <i>Ixodes ricinus</i> (Liste des pathogènes les plus fréquents, non exhaustive)..... | 25 |
| Tableau 2 : Composés (répulsifs et acaricides) actuellement autorisés et utilisés pour se protéger des piqûres de tiques. | 37 |
| Tableau 3 : Liste non exhaustive des huiles essentielles étudiées pour lutter contre les tiques, ainsi que les composés présents dans ces huiles en particulier. | 39 |
| Tableau 4 : Premières apparitions de résistances chez la tique <i>R. microplus</i> présente dans les élevages. . | 40 |
| Tableau 5 : Liste de modulateurs allostériques des récepteurs nicotiniques (non-exhaustive)..... | 64 |
| Tableau 6 : Récapitulatif des espèces d'arthropodes dont l'étude du génome (du transcriptome pour <i>P. pseudoannulata</i>) a été réalisée et dont les sous-unités de nAChRs ont été décrites (liste non exhaustive). | 66 |
| Tableau 7 : Description des paramètres utilisés pour l'analyse statistique (inspirée par le guide d'utilisation du logiciel ToxTrack, version 2.61). | 111 |
| Tableau 8 : Amorces utilisées pour réaliser une amplification de la région codante des séquences de sous-unités de nAChRs de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 118 |
| Tableau 9 : Amorces utilisées pour réaliser une amplification des régions 5' et 3' incluant les régions codantes et non codantes de la séquence α 1 de la tique <i>Ixodes ricinus</i> . « <i>Nested PCR</i> » signifie PCR emboîtée..... | 121 |
| Tableau 10 : Description des amorces utilisées pour amplifier les ORF des sous-unités de nAChRs de la tique <i>Ixodes ricinus</i> | 125 |

Listes des figures et tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 11 : Description des amorces utilisées lors des criblages des clones par PCR pour les vecteurs pCR TM 2.1-TOPO® et pGEM. | 128 |
| Tableau 12 : Description du mélange réactionnel pour effectuer des amplifications avec la GoTaq® G2 Flexi (Promega) pour le criblage des colonies bactériennes par PCR. | 128 |
| Tableau 13 : Description d'une matrice d'identité de séquence entre les sous-unités de références appartenant à <i>D. melanogaster</i> et les séquences des sous-unités provenant du synganglion de la tique <i>I. ricinus</i> | 170 |

Annexes

Annexe 1 : Récapitulatifs des programmes PCR utilisés

| Amplification | Sous-unité | Couple d'amorces | Séquences (5' → 3') | Enzyme | Programme PCR |
|---------------|------------|--|---|--------|---|
| ORF | α2 | IricA2-CDS-F IricA2-CDS-R | CAGGCGTGCCATGGCCTTC GTCCTGGCGAGAGCGTGTTC | Q5® | 98°C – 30 sec ; 35 x [98°C – 10 sec ; 61°C – 30 sec ; 72°C – 1 min] ; 72°C – 2 min |
| ORF | α5 | IricA5-CDS-F IricA5-CDS-R | GTTCCGTGGCGACGTTTGT TGCTTGTCTTCGACAGCACG | Q5® | 98°C – 30 sec ; 35 x [98°C – 10 sec ; 55°C – 30 sec ; 72°C – 1 min] ; 72°C – 2 min |
| ORF | α6 | IricA6-CDS-F IricA6-CDS-R | ATGAGGAGGACGGCGGAT CTACGCGACCAAGTGGGTGCC | Q5® | 98°C – 30 sec ; 30 x [98°C – 10 sec ; 68°C – 30 sec ; 72°C – 1 min] ; 72°C – 2 min |
| RACE PCR | α1 | IricA1-SP2 <i>Oligo-d(T)-Anchor</i> | CCGAGTGAAGGATTGCCTTGGTCA GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT | Q5® | 98°C – 2 min sec ; 10 x [98°C – 15 sec ; 56°C – 30 sec ; 72°C – 40 sec] ; 25 x [98°C – 15 sec ; 56°C – 30 sec ; 72°C – 40 sec*] ; 72°C – 7 min |
| | | IricA1-SP3 <i>Oligo-d(T)-Anchor</i> | GGGTCCCAGCGCAATTTGTAATCG GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT | Q5® | 98°C – 2 min sec ; 10 x [98°C – 15 sec ; 56°C – 30 sec ; 72°C – 40 sec] ; 25 x [98°C – 15 sec ; 56°C – 30 sec ; 72°C – 40 sec*] ; 72°C – 7 min |
| | | IricA1-SP5 <i>Oligo-d(T)-Anchor</i> | TAAGATGGCGCCCTGGGTCAAGCAC GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTTTTTTTTTTTTTT | Q5® | 98°C – 2 min ; 10 x [98°C – 15 sec ; 60°C – 30 sec ; 72°C – 40 sec] ; 25 x [98°C – 15 sec ; 60°C – 30 sec ; 72°C – 40 sec*] ; 72°C – 7 min |

* Pour l'étape d'élongation, une incrémentation de 20 sec d'élongation à chaque cycle a été effectué (ex : cycle n°11 = 40 sec, n°12 = 60 sec, n°13 = 80 sec).

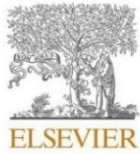
Annexes

| Amplification | Sous-unité | Couple d'amorces | Séquences (5' → 3') | Enzyme | Programme PCR |
|-------------------|---------------------------------|------------------------------|--|-----------------|--|
| Insertion pGem | α1 | IricA1-ORF-F IricA1-ORF-R | gaatataGGATCCTGCCATGGGCGGG (BamHI) cttacTCTAGACGGCTTCAGTCGTGG (XbaI) | Q5® | 98°C – 30 sec ; 35 x [98°C – 10 sec ; 68°C – 30 sec ; 72°C – 1 min] ; 72°C – 2 min |
| Insertion pGem | α2 | IricA2-ORF-F IricA2-ORF-R | taatCCCGGGCAGGCGTGCCATGGCCTTTC (XmaI) attaTCTAGAGTCCTGGCGAGAGCGTGTTTCA (XbaI) | Q5® | 98°C – 30 sec ; 35 x [98°C – 10 sec ; 61°C – 30 sec ; 72°C – 1 min] ; 72°C – 2 min |
| Insertion pGem | α6 | IricA6-ORF-F IricA6-ORF-R | taatCCCGGGATGAGGAGGACGGCGCGAT (XmaI) attaTCTAGACTACGCGACCAAGTGCGGTGCC (XbaI) | Q5® | 98°C – 30 sec ; 30 x [98°C – 10 sec ; 68°C – 30 sec ; 72°C – 1 min] ; 72°C – 2 min |
| Criblage colonies | pCR TM 2.1- TOPO® | M13F M13R | CAGGAAACAGCTATGAC GTAAAACGACGGCCAG | GoTaq® G2 Flexi | 95°C – 2 min ; 30 x [95°C – 45 sec ; 55°C – 45 sec ; 72 °C – X min] ; 72 °C – 5 min. |
| Criblage colonies | pGem | pG-1S Xen-3R | CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG GGAGCAGATACGAATGGCTAC | GoTaq® G2 Flexi | 95°C – 2 min ; 30 x [95°C – 45 sec ; 60°C – 45 sec ; 72 °C – X min] ; 72 °C – 5 min. |

Les temps d'élongation (X) à l'intérieur du cycle de température varie en fonction de la longueur de l'insert à amplifier (allant de 30 sec à 2 min)

Annexe 2 : Nicotinic acetylcholine receptors in the synganglion of the tick *Ixodes ricinus*: Functional characterization using membrane microtransplantation (Le Mauff et al., 2020)

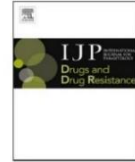
International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 14 (2020) 144–151



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpddr



Nicotinic acetylcholine receptors in the synganglion of the tick *Ixodes ricinus*: Functional characterization using membrane microtransplantation

Anaïs Le Mauff^a, Hamza Chouikh^a, Alison Cartereau^a, Claude L. Charvet^b, Cédric Neveu^b, Claude Rispé^c, Olivier Plantard^c, Emiliane Taillebois^a, Steeve H. Thany^{a,*}

^a LBLGC USC INRAE 1328, Université d'Orléans, 1 rue de Chartres, 45067, Orléans, France

^b INRAE, Oniris, BIOEPAR, 44307, Nantes, France

^c INRAE, ISP, 37380, Nouzilly, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Tick
Ixodes ricinus
Synganglion membrane
Microtransplantation
Nicotinic acetylcholine receptors

ABSTRACT

Nicotinic acetylcholine receptors are an important class of excitatory receptors in the central nervous system of arthropods. In the ticks *Ixodes ricinus*, the functional and pharmacological properties of nicotinic receptors located in their neurons are still unknown. The objective of this study was to characterize the pharmacological properties of tick nicotinic receptors using membrane microtransplantation in *Xenopus laevis* oocytes and two-electrodes voltage clamp method. The membranes microtransplanted were extracted from the tick synganglion. We found that oocytes microtransplanted with tick synganglion membranes expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes which were activated by acetylcholine (1 mM) and nicotine (1 mM). Currents induced by pressure application of acetylcholine and nicotine were diminished by 10 nM α -bungarotoxin and methyllycaconitine, suggesting that they expressed two subtypes of nicotinic receptors, α -bungarotoxin-sensitive and -insensitive, respectively. In addition, we found that nicotine receptors expressed in the synganglion membranes were poorly sensitive to the neonicotinoid insecticides clothianidin (CLT), imidacloprid (IMI), acetamiprid (ACE) and thiamethoxam (TMX), in agreement with their lack of activity as acaricides. Interestingly, current amplitudes were strongly potentiated in the presence of 1 μ M PNU-120596. CLT was more active as an agonist than IMI, TMX and ACE. Finally, we demonstrated that microtransplantation of purified membrane from the tick synganglion can be a valuable tool for the development and screening of compounds targeting tick nicotinic acetylcholine receptor subtypes.

1. Introduction

Ticks are known as harmful hematophagous ectoparasites and vectors of many pathogenic viruses, bacteria, and protozoa of medical and veterinary importance (Lindquist, 2008). They constitute major parasites for animal health through their role as vectors of various vector-borne-diseases (theileriosis and babesiosis, cowdriosis, ...) or through blood depletion. Ten percent of the currently known tick species act as pathogenic agents causing a broad range of animal and human diseases (Jongejan and Uilenberg, 2004). Some tick species such as the forest tick, *Ixodes ricinus*, transmit a number of tick-borne diseases to human, e.g. Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis (Barbour and Benach, 2019). These diseases can lead to different health issues including neurodegenerative problems, cardiac disorder or arthritic pain (Cardenas-de la Garza et al., 2019). The increase over the last

decades in the number of newly discovered tick-borne agents, and the absence of anti-tick vaccines, has prompted the search of new strategies to limit tick-borne diseases and biting. Thus, one strategy is understanding the pharmacological properties of tick ion channels, in particular nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), which are members of the cys-loop ligand gated ion channel superfamily that mediates the rapid neurotransmission. In insects and mammals, pharmacological approaches using electrophysiological studies indicated the existence of different nAChR subtypes. Functional nAChRs exist as hetero- or homopentamer subtypes, with diverse pharmacological profiles and kinetic properties. Evidence suggest some similarities between vertebrate nAChR subtypes containing the α 7-subunit and insect α -bungarotoxin (α -Bgt)-sensitive receptors (Thany et al., 2007). Moreover, in contrast to their poor agonist activity on mammalian nAChRs (Tomizawa et al., 2003), neonicotinoid insecticides differentially activated insect

* Corresponding author.

E-mail address: steeve.thany@univ-orleans.fr (S.H. Thany).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.10.005>

Received 15 May 2020; Received in revised form 4 October 2020; Accepted 7 October 2020

Available online 16 October 2020

2211-3207/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND

license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

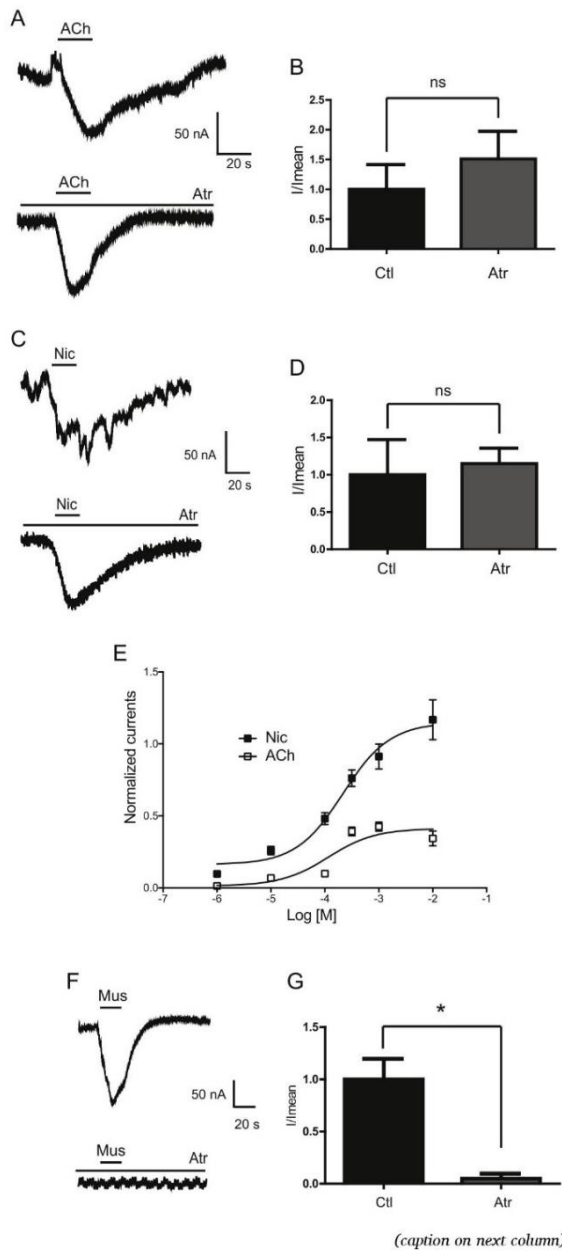


Fig. 1. Properties of acetylcholine and nicotine currents in oocytes micro-transplanted with tick synganglion membranes. (A and B) Currents elicited by 1 mM acetylcholine (ACh). Top current without atropine (control, Ctl) and below with 0.5 μ M atropine (Atr). Horizontal bars above each response indicate the compound application. The perfusion time was 20 s. Histograms illustrate the comparison between ACh without atropine (Ctl) or with 0.5 μ M atropine (Atr) ($p > 0.05$, $n = 16$, ns = no significant). (C and D) Currents elicited by 1 mM nicotine (Nic) compared in control condition (Ctl: without atropine) and under bath application of 0.5 μ M atropine (Atr). Histograms show that there are no significant changes in the current amplitude ($p > 0.05$, $n = 23$, ns = no significant). (E) ACh and nicotine concentration-current response relationships from $n = 12$, in the presence of 0.5 μ M atropine. Each point represents peak currents normalized to I_{mean}. (F and G) Currents elicited by 1 mM muscarine. Top current represents 1 mM muscarine (Mus)-induced current, and below the blocking activity induced by 0.5 μ M atropine. Histograms illustrate the current amplitudes between muscarine without atropine (control condition, Ctl) and with 0.5 μ M atropine (Atr). $n = 8$, * $p < 0.05$. In each histogram, data are mean \pm S.E.M.

nAChR subtypes or binding sites (Thany, 2009, 2011; Taillebois et al., 2018; Houchat et al., 2019). Transcriptomic analyses on the tick *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis* synganglia have shown that they expressed cDNAs encoding for nAChR subunits (Lees et al., 2010; Bissinger et al., 2011). Recently, Lees et al., demonstrated that *R. sanguineus* $\alpha 1$ subunit co-expressed with the chicken $\beta 2$ subunit, in the *Xenopus oocytes*, evoked acetylcholine (ACh) and nicotine currents, but the expressed hybrid receptor was insensitive to IMI (Lees et al., 2014). We propose that different nAChR subtypes exist in the tick nervous system and account for the binding of neonicotinoid insecticides. Thus, in the present study, we aimed to characterize the functional properties of tick native nAChRs expressed in the synganglion, in particular, if they are similarly activated by ACh and nicotine, sensitive to neonicotinoid insecticides and blocked by nAChR antagonists, as found with other arthropods (Tan et al., 2007; Thany et al., 2007).

The *Xenopus laevis* oocyte as proven to be an efficient system for the heterologous functional expression of ligand-gated and voltage-gated ion channels (Eusebi et al., 2009; Millar and Gotti, 2009). Here, we used a method that is well known with mammalian model but has been rarely used for arthropods, the microtransplantation of purified membranes from neuronal tissues into *Xenopus oocytes* (Miledi et al., 2002; Palma et al., 2003; Eusebi et al., 2009; Murenzi et al., 2017). Microtransplantation of oocytes with membranes prepared from rat pituitary GH (4)C1 cells, stably expressing human neuronal $\alpha 7$ nAChRs or human embryonic kidney cell line (HEK293) expressing $\alpha 4\beta 2$ receptors, led to functional receptors with native properties of the corresponding cell lines (Palma et al., 2003). In particular, dose-response curve relationships, agonist and antagonist sensitivity. Indeed, ACh currents from GH (4)C1- $\alpha 7$ gave a linear current-voltage curve at hyperpolarized membrane potentials, with ACh-evoked currents blocked by the $\alpha 7$ nicotinic antagonist methyllycaconitine (MLA). In contrast, ACh currents through HEK- $\alpha 4\beta 2$ cells were inhibited by the competitive blocker dihydro- β -erythroidine (DH β E) and the ACh dose-response curve was bimodal (Palma et al., 2003). Recently, microtransplantation was also used with success for an insect model, the aphid *Acyrtosiphon pisum*, where extracted membranes were microtransplanted into *Xenopus oocytes* (Crespin et al., 2016). Electrophysiological recordings demonstrated that aphid membranes expressed nAChR subtypes activated by ACh and nicotine (Crespin et al., 2016). More broadly, this method allowed the characterisation of the functional properties of transmembrane proteins in their native environment (Eusebi et al., 2009). Thus, we applied this approach to study the pharmacological profile of *Ixodes ricinus* neuronal nAChR subtypes, by extracting cell membranes from the synganglion.

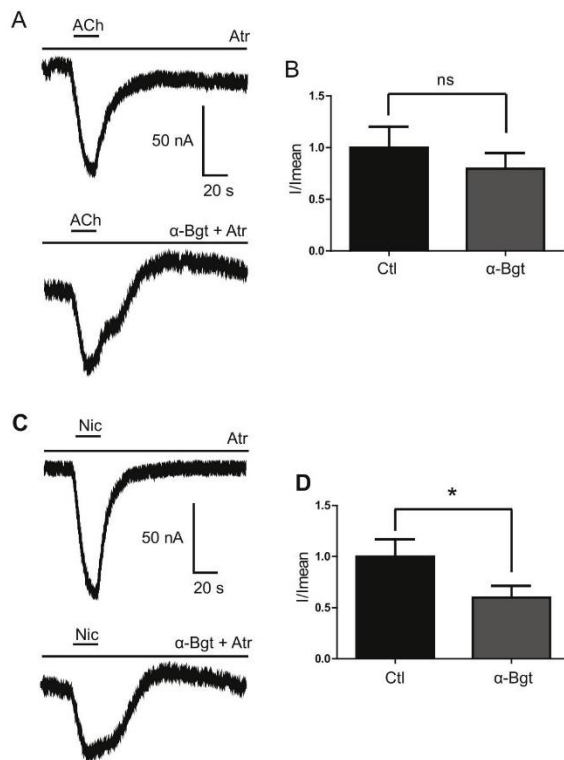


Fig. 2. Effect of α -Bgt on ACh- and nicotine-evoked currents in oocyte microtransplanted with tick synganglion membranes. (A and B) Currents elicited by 1 mM ACh. Top current without α -Bgt and below with 10 nM α -Bgt. Horizontal bars above each response indicate the compound application, and the perfusion time was 20 s. Histograms illustrate the comparison between ACh without 10 nM α -Bgt (Ctl) or with 10 nM α -Bgt. $P > 0.05$, $n = 9$, ns = no significant. (C and D) Currents elicited by 1 mM nicotine (Nic), without and under bath application of 10 nM α -Bgt. Histograms illustrating current amplitudes when α -Bgt is added in the bath. Each histogram represents $n = 10$, * $p < 0.05$.

2. Materials and methods

2.1. Ticks breeding and sample collection

Female adult *Ixodes ricinus* were collected in the state forest of Chize, next to the CEBC laboratory (CNRS UMR 7372, Université de La Rochelle, Villiers-en-Bois, France) and provided by the BIOEPAR laboratory (INRAE, ONIRIS, Nantes, France). The synganglia of female ticks were extracted in PBS (8.10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 1.44 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 137 mM NaCl) and conserved at -80°C before membrane extraction.

2.2. Membrane preparation

A pool of 150 synganglia was prepared, as described in Crespin et al. (2016), with the following modifications. Synganglia were mechanically dissociated in 500 μl of extraction buffer (50 mM Tris/HCl, 1 mM EGTA, 3 mM EDTA, supplemented with protease inhibitors) using a pellet Argos mixer (World Precision Instruments, Hertfordshire, UK). All experiments were conducted at 4°C . The solution was first centrifuged 1 min at 1500 rpm. The supernatant was collected in a new tube with 5 ml of extraction buffer, then homogenized and centrifuged at 15,000 rpm for 70 min. The pellet containing synganglion membranes was further

concentrated using a sucrose gradient (7 ml of 20% sucrose and 5 ml of 50% sucrose, respectively), and centrifuged at 26,200 rpm, for 2 h 45 min. The membrane fraction located between 20% and 50% sucrose phase was supplemented with 20 ml of extraction buffer, then centrifuged at 26,200 rpm, for 50 min. The pellet was resuspended in 5 ml of glycine buffer, centrifuged 45 min at 26,200 rpm. Then, collected in 100 μl of glycine buffer and stored at -80°C .

2.3. Protein quantification

Protein quantification was carried out with the Bradford test method (Hammond and Kruger, 1988). For each solution, 5 μl were deposited on a 96-well microplate. In each well, 250 μl of Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Inc.) were added. After 10 min incubation at room temperature, the plate was read at 595 nm with a microplate reader (μ Quant, Bio-Tek Instrument) (Hammond and Kruger, 1988). Results were calculated from a standard range of BSA (0–2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Concentration of membrane proteins was around 2495 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.4. *Xenopus* oocyte preparation

Xenopus laevis oocytes were provided by CRB (University of Rennes 1, Rennes, France). The CRB Xenope is a French national platform dedicated to *X. laevis* breeding for experimental research. Oocytes were defolliculated according to Cartereau et al. (2018), and were incubated in a standard oocyte saline (SOS) solution (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 and 5 mM HEPES, pH 7.5) supplemented with antibiotics (50 mg/ml gentamycin, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 2.5 mM pyruvate). Defolliculated oocytes were microinjected with 36.8 nl of the tick membrane solution using a nanoliter injector (Nanoliter, 2010; World Precision Instruments, Hertfordshire, UK) and were incubated in the SOS solution at 18°C during 24 h before electrophysiological measurements.

2.5. Electrophysiological recording

A two-electrodes voltage clamp technique was used to record neuronal receptor responses from *I. ricinus* synganglion membranes microtransplanted in oocytes. Electrodes were prepared with a glass puller (model P-97, Sutter Instrument), filled with a 3 M KCl solution and the resistance was controlled to be between 0.1 and 3 M Ω . After incubation, oocytes were placed in a recording chamber at room temperature (20 – 22°C), with a continuous flow of SOS supplemented with atropine (0.5 mM) or not (addition of atropine allows the inhibition of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) responses and thus, to selectively record the nAChR responses). All compounds were diluted at 1 mM with SOS or SOS with atropine. Recordings were made using a Digidata-1322 A (Axon Instruments) A/D converter and analyzed with pCLAMP 10 (Molecular Devices, Union City, CA, USA). The oocyte membrane potential was held at -60 mV and perfusion for each molecule tested was performed during 20 s. After the application of one molecule, oocytes were washed with a continuous flow of SOS or SOS with atropine, during 5 min.

2.6. Fluorescence labelling of tick synganglion nAChRs

To visualize by fluorescence the presence of α -Bgt-sensitive nAChRs on the tick synganglion membranes, we used α -Bgt conjugated with a fluorescent probe, Alexa Fluor-488 (Thermo Fisher Scientific, France). 20 μl of tick membrane solution was mixed with 100 μl PBS (0.25% BSA) and 10 μl Alexa Fluor-488- α -Bgt solution (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), at room temperature during 4 h. The mix was centrifugated at 14,000 rpm during 20 min, at 4°C . The pellet was collected in 500 μl PBS (0.25% BSA) and centrifuged at 10,000 rpm during 20 min, at 4°C . Then, stored in 2–5 μl PBS (0.25 BSA). The fluorescence was visualized on glass slip (glycerol/PBS) with an inverted microscope, Olympus IX3 (Olympus, France).

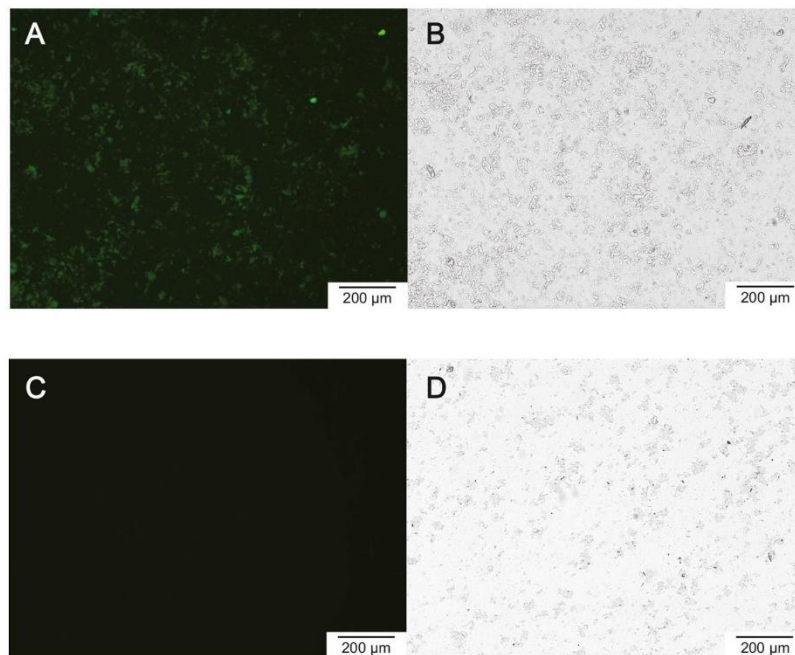


Fig. 3. Fluorescent labelling of tick synganglion membranes showing the presence of nAChRs α -Bgt -sensitive subtypes, using fluorescence microscopy. (A) Synganglion membrane stained with Alexa Fluor 488- α -Bgt complex. (B) The same preparation as A, visualized with transmitted light. (C) Synganglion membrane as a control preparation, without Alexa Fluor 488- α -Bgt complex. (D) The same preparation as C, visualized with transmitted light. Scale bar = 200 μ m.

2.7. Drugs

ACh, nicotine, atropine, PNU-120956, MLA, α -Bgt, mecamlamine, clothianidin (CLT), IMI, acetamidrid (ACE) and thiamethoxam (TMX) were purchased from Sigma (St Quentin, France). They were dissolved first in 100% DMSO and then diluted in SOS at a final concentration of 0.01% DMSO.

2.8. Statistical analysis

Currents were normalized using the mean current amplitudes under the same control conditions (I/I_{mean}). Data were shown as mean \pm S.E. M and analyzed using Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences between normalized currents from control and experimental groups were analyzed using one-way Anova and Wilcoxon paired test (samples < 30), using Prism 7. The EC_{50} values for ACh and nicotine were determined using nonlinear regression on normalized data (1 mM ACh as maximal response) using Prism 7. The dose–response curves were derived from the fitted curve following the equation: $Y = I_{\text{min}} + (I_{\text{max}} - I_{\text{min}}) / (1 + 10^{(\log(EC_{50} - X)/H)})$ where Y is the normalized response, I_{max} and I_{min} are the maximum and minimum responses, H is the Hill coefficient, EC_{50} is the concentration giving half the maximum response and X is the logarithm of the compound concentration. In all experiments, 'n' represents the number of tested oocytes.

3. Results

3.1. Expression of tick native nicotinic acetylcholine receptors in the synganglion membranes

The oocytes microtransplanted with tick synganglion membranes expressed nAChR subtypes which were highly variables in terms of currents stability (data not shown). Indeed, application of 1 mM ACh or

nicotine evoked inward currents which were unstable over the time (Fig. 1). This suggested that ACh and nicotine currents are mediated by complex responses including muscarinic ACh receptors. Thus, to establish the conditions for measuring stable ACh- and nicotine-induced currents, we added in the bath 0.5 μ M atropine, to block muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs). In this condition, application of 1 mM ACh, in the presence of 0.5 μ M atropine, evoked a stable current without affecting the current amplitudes (Fig. 1A and B). Similar currents were detected with 1 mM nicotine (Fig. 1C and D). Currents were also slowed with a slow rate of desensitization, but with no change in the current amplitudes (Fig. 1C and D). Subsequently, in all experiments, 0.5 μ M atropine was added in the bath to study nAChRs and block the ionic currents resulting from mAChRs activation. Thus, in the presence of 0.5 μ M atropine, 20 s application of ACh and nicotine evoked stable inward currents with peak amplitudes ranging from -75 ± 10 nA to -96 ± 13 nA at 1 mM ACh and nicotine, respectively (n = 20). Concentration–response relationships performed with ACh and nicotine revealed an EC_{50} values of 115.4 μ M and 216.2 μ M (n = 20, Fig. 1E), respectively. We also observed that application of 1 mM muscarine (Mus) resulted in an inward current of -105 ± 14 nA but did not induce variable current amplitude as found with ACh and nicotine. Currents were completely blocked by 0.5 μ M atropine, confirming that ACh- and nicotine-evoked currents were affected by the presence in the injected membranes of muscarinic ACh receptors (Fig. 1F and G). In order to characterize nAChR subtypes involved in ACh- and nicotine-elicited currents, the nAChR antagonist, α -bungarotoxin (α -Bgt) was bath applied during 15 min. The currents mediated by 1 mM ACh were neither blocked or diminished by 10 nM α -Bgt but nicotine-induced currents were partially inhibited by 10 nM α -Bgt (n = 10, $p < 0.05$, Fig. 2), suggesting that α -Bgt-sensitive receptors are present in the synganglion membranes. To confirm this hypothesis, membranes were treated with bright and photostable Alexa fluor 488- α -Bgt to visualize α -Bgt-sensitive receptors. As it can be seen in Fig. 3A, specific

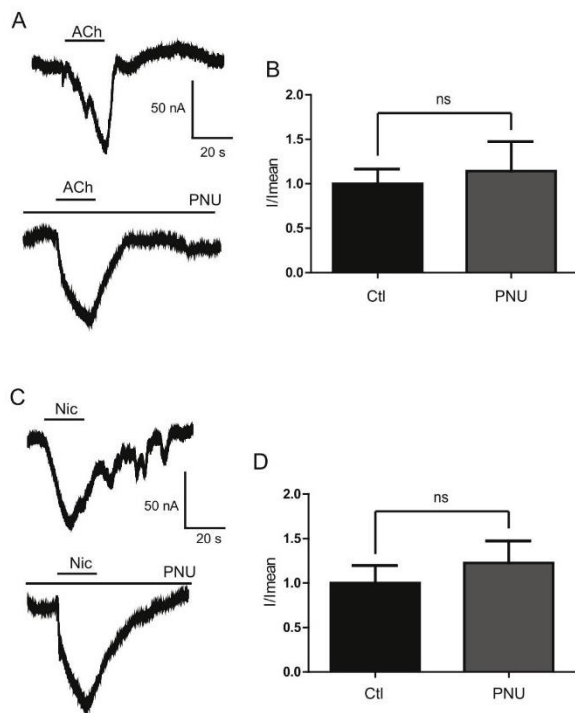


Fig. 4. Modulatory effect of PNU-120596 (PNU) on ACh- and nicotine-evoked currents in oocytes microtransplanted with tick synganglion membranes. (A and B) Currents elicited by 1 mM ACh. Top current without PNU-120596 (PNU) and below with 1 μ M PNU-120596. Each horizontal bars indicates when the compound was added. Histograms illustrate the comparison between ACh without PNU-120596 (Ctl) or with 1 μ M PNU-120596. $P > 0.05$, $n = 8$, ns = no significant. (C and D) Currents elicited by 1 mM nicotine and under bath application of 1 μ M PNU-120596. Histograms show that there is no significant difference in the current amplitude when PNU-120596 was added in the bath. $P > 0.05$, $n = 9$, ns = no significant. Each histogram represents mean \pm S.E.M, and the perfusion time was 20 s.

fluorescence spots were observed in synganglion membranes preparation and no fluorescence spots were found in the control solutions. These data confirmed that α -Bgt-sensitive receptors were expressed in the synganglion membranes expressed in the oocytes.

3.2. Effect of PNU-120596 on ACh and nicotine responses

PNU-120596 (PNU) is a positive allosteric modulator of nAChRs (Kalappa and Uteshev, 2013). Here, we were interested to study its effect on ACh and nicotine currents. In the presence of bath application of 1 μ M PNU, ACh and nicotine current amplitudes were not significantly different ($p > 0.05$, $n = 12$, Fig. 4). Note that, application of PNU on non-injected oocytes did not induce currents (data not shown). Interestingly, bath application of 1 μ M PNU with 0.5 μ M atropine, strongly potentiated ACh and nicotine responses (Fig. 5). Currents induced by 1 mM ACh were increased from $-96 \text{ nA} \pm 5 \text{ nA}$ to $-175 \pm 20 \text{ nA}$, in presence of 1 μ M PNU and 0.5 μ M atropine ($n = 11$, $p < 0.05$, Fig. 5A and B). Similarly, nicotine-induced currents were increased from $-105 \text{ nA} \pm 0.5 \text{ nA}$ to $-241 \text{ nA} \pm 4.5 \text{ nA}$ ($n = 23$, $p < 0.05$, Fig. 5C and D). Based on these results, oocytes microtransplanted with tick synganglion membranes were incubated with 10 nM α -Bgt in the presence of both 0.5 μ M atropine and 1 μ M PNU (Fig. 6). ACh- and nicotine-induced currents were significantly reduced by respectively $\sim 33\%$ ($n = 7$, $p < 0.05$, Fig. 6A and B) and $\sim 47\%$ ($n = 13$, $p < 0.05$, Fig. 6C and D). Moreover, we examined

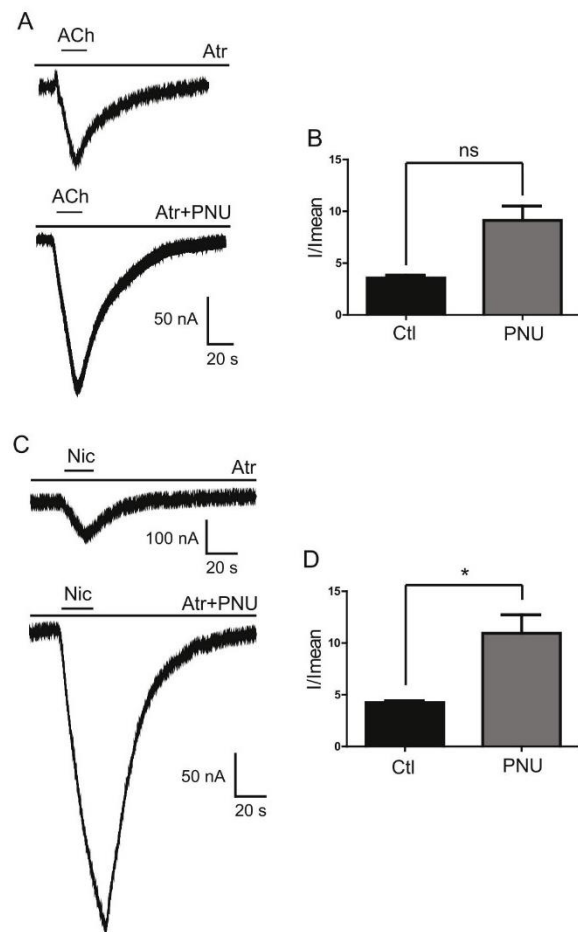


Fig. 5. Modulatory effect of combined application of atropine and PNU-120596 on ACh- and nicotine-evoked currents in oocyte microtransplanted with tick synganglion membranes. (A and B) In top: currents elicited by 1 mM ACh in presence of 0.5 μ M atropine (Atr). Below: in the presence of 0.5 μ M atropine (Atr) and 1 μ M PNU-120596 (PNU). Horizontal bars indicate the compound application. Histograms illustrate the mean current amplitudes and represent, $n = 11$. (C and D) Currents induced by 1 mM nicotine under 0.5 μ M atropine (Atr) and bath application of 0.5 μ M atropine and 1 μ M PNU (PNU). Histograms illustrate current amplitudes and show that there is a significant difference. Each histogram represents $n = 23$. Note that in all cases, the perfusion time for ACh and nicotine was 20 s, histogram are mean \pm S.E.M and * $p < 0.05$.

the effect of the nAChR antagonists, mecamylamine and the selective α -Bgt-sensitive nAChRs, methyllycaconitine (MLA) (Davies et al., 1999), on ACh- and nicotine-evoked currents. Mecamylamine and MLA did not inhibit ACh-evoked currents when applied at concentrations of 1 μ M for mecamylamine ($p > 0.05$, $n = 12$, Fig. 7A and B) and 10 nM for MLA ($p > 0.05$, $n = 7$, Fig. 7C and D), respectively. Using the same conditions, we found that currents induced by 1 mM nicotine were not affected by 1 μ M mecamylamine ($p > 0.05$, $n = 9$, Fig. 8A and B), but they were diminished by 33% when 10 nM MLA was added in the bath ($p < 0.05$, $n = 12$, Fig. 8C and D), confirming the presence of α -Bgt-sensitive receptors.

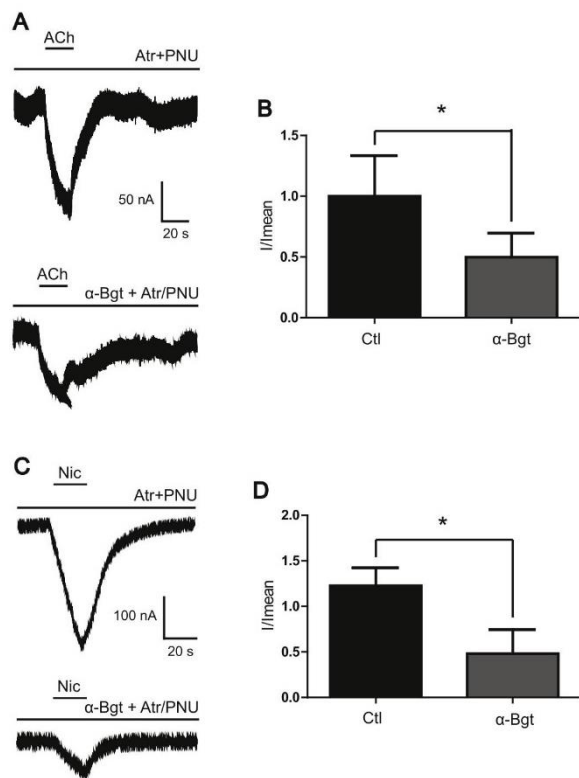


Fig. 6. Effect of α -Bgt under bath application of 0.5 μ M atropine (Atr) and 1 μ M PNU-120596. (A and B) Currents elicited by 1 mM ACh without 10 nM α -Bgt, top current, and with 10 nM α -Bgt (below). Horizontal bars indicate the compound application. Histograms illustrate currents recorded in the same conditions, and represent $n = 7$. (C and D) Currents elicited by 1 mM nicotine (Nic) without α -Bgt and under bath application of 10 nM α -Bgt. Histograms show that there is a significant difference in the current amplitude when 10 nM α -Bgt is added in the bath. Each histograms represent $n = 13$. In all case, each histogram represent mean \pm S.E.M and * $p < 0.05$.

3.3. Effect of neonicotinoid insecticides on tick synganglion membranes expressed in *Xenopus oocytes*

The ability of neonicotinoid insecticides to act as agonists of the tick nAChRs expressed in the synganglion was examined by recording the currents induced by 1 mM CLT, IMI, TMX and ACE. The four neonicotinoids were poor activators of tick nAChRs. The mean current amplitude induced by each compound was less than -15 nA (Fig. 9) whereas previous studies demonstrated that they can activate insect nAChRs as agonists (Tan et al., 2007; Thany, 2009). We then evaluated the agonist effect of the four neonicotinoid insecticides in the presence of 1 μ M PNU-120596. CLT appeared the more effective, with a mean current amplitude of -258 ± 38 nA ($p < 0.05$, $n = 9$, Fig. 9A and B), demonstrating that CLT-induced responses were potentiated by 32 fold. When IMI, TMX and ACE were applied, responses were potentiated by 6.42, 4.6 and 5.5, respectively (Fig. 9C–H). We demonstrated that PNU-120596 significantly increased the current amplitudes induced by neonicotinoid insecticides, and that it had similar action on ACh, nicotine and neonicotinoids.

4. Discussion

In the present study, we demonstrated for the first time that

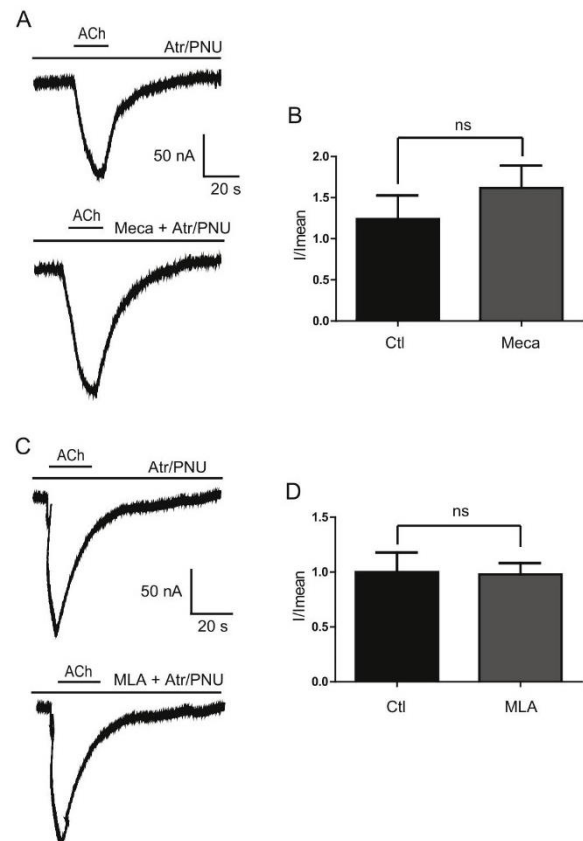


Fig. 7. Effect of mecamylamine and methyllycaconitine on ACh-evoked currents. 1 mM ACh (20 s, horizontal bar) currents were recorded under bath application of 0.5 μ M atropine (Atr) and 1 μ M PNU-120596 (PNU). (A and B) As shown, 1 μ M mecamylamine (Meca) has no effect on 1 mM ACh-induced currents. Each histogram represents mean \pm S.E.M of $n = 12$. ns = no significant and $p > 0.05$. (C and D) Similarly, 10 nM MLA has no effect on ACh currents. Histograms illustrate the current amplitudes and represents mean \pm S.E.M of $n = 7$, $p > 0.05$. Ctl: represents application of ACh without 1 μ M mecamylamine or 10 nM MLA.

microtransplantation of ticks synganglion membranes into *X. laevis* oocytes allows a functional characterisation of nAChRs of this arthropod taxa of major importance for human and animal health. We found that the functional expression of nAChRs could be studied when nAChRs were blocked by atropine. The presence of muscarinic and nicotinic receptors in the synganglia was previously demonstrated by transcriptomic analyses in the female synganglion of the black-legged tick *Ixodes scapularis* (Egekwu et al., 2014; Gulia-Nuss et al., 2016) and of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Lees et al., 2010). Here, we injected *X. laevis* oocytes with tick synganglion membranes containing native nAChRs to investigate their expression and pharmacological properties. We found that both ACh- and nicotine-induced currents had slow kinetic currents. Indeed, using the two-electrodes voltage clamp method, we found that ACh and nicotine mediated substantially equivalent currents, with rapid desensitization. The reasons for the difference of responses induced when using microtransplanted oocytes with membrane preparations were unknown. In previous studies it was found that application of AMPA to HEK-GLUR1 cells elicited inward currents which decayed faster in oocytes than in HEK cells (Palma et al., 2003). It was proposed that this difference could be due to internal cell signaling between membrane preparations in the oocytes and the

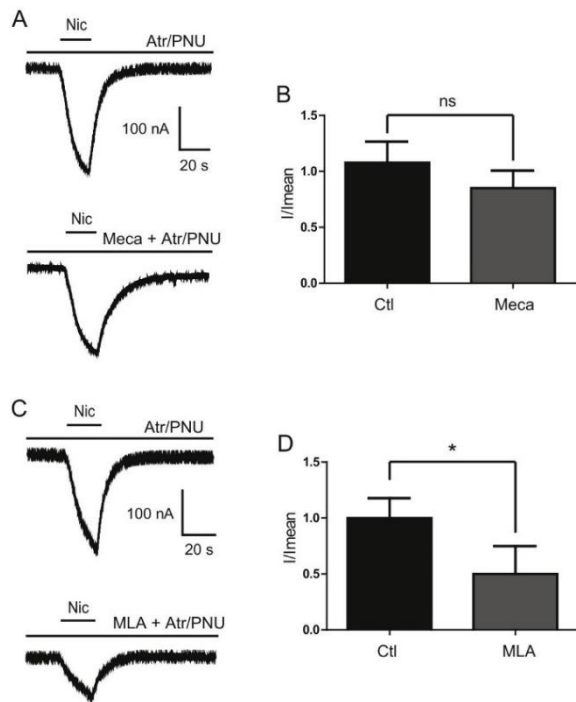


Fig. 8. Effect of mecamlamine and methyllycaonitine on nicotine-evoked currents. All currents were recorded under bath application of 0.5 μ M atropine (Atr) and 1 μ M PNU-120596 (PNU). (A and B) Currents elicited by 1 mM nicotine (Nic) are not affected by 1 μ M mecamlamine (Meca). Each histogram represents mean \pm S.E.M of $n = 9$, ns = no significant, $p > 0.05$. (C and D) Currents elicited by 1 mM nicotine (Nic, 20 s, horizontal bar) are diminished by 10 nM MLA. Histograms illustrate the effect of 10 nM MLA, and represent mean \pm S.E.M of $n = 12$, $*p < 0.05$. Ctl: represents application of 1 mM nicotine without 1 μ M mecamlamine or 10 nM MLA.

recording of nicotinic receptors on native cells. Using *R. sanguineus* nAChR $\alpha 1$ subunit, it was found that its expression into *X. laevis* oocytes failed to function as a homomer. When co-expressed with chicken $\beta 2$ subunit, the chimeric $\alpha 1\beta 2$ nAChR evoked inward currents with a slow activation and deactivation kinetics, in response to ACh and nicotine (Lees et al., 2014). We however argued that the functional properties of expressed receptors could be influenced by the host heterologous cell expression system, in terms of activation and deactivation currents induced by agonists. Despite this kinetic difference of currents, we demonstrated that synganglion membranes injected in the oocytes expressed functional receptors. We found also that they were sensitive to the nAChR antagonists, suggesting that tick synganglion membranes expressed α -Bgt-sensitive and -insensitive nAChR subtypes. Note that, because two types of mAChRs are present in several arthropods (Collin et al., 2013), we suggest that atropine could block type A receptors instead of type B. Moreover, under PNU-120596 application, we demonstrated that ACh and nicotine-evoked currents were significantly increased and diminished by MLA, confirming that (i) ACh and nicotine currents were potentiated by PNU-120596 and (ii) the presence of α -Bgt-sensitive receptors in the tick synganglia. Moreover, similar increase of currents was also confirmed with the four neonicotinoid insecticides, IMI, CLT, TMX and ACE. We found that neonicotinoids are poor activators of tick nAChRs and neonicotinoid elicited currents were strongly increased by PNU-120596. CLT was more active as an agonist than IMI, TMX and ACE.

Pending on the characterization of tick *Ixodes ricinus* native

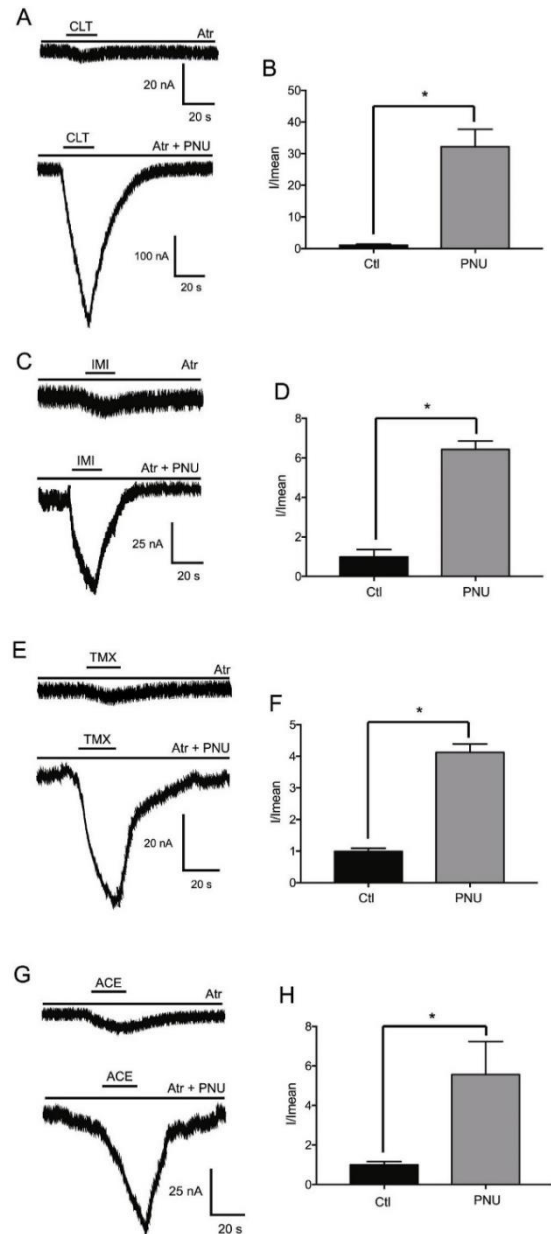


Fig. 9. Effect of PNU-120596 on current evoked by the neonicotinoid compounds, clothianidin (CLT), imidacloprid (IMI), thiamethoxam (TMX) and acetamiprid (ACE), in oocyte microtransplanted with tick synganglion membranes. In all case, we found that, current induced by 1 mM of each neonicotinoid are significantly increased under bath application of 1 μ M PNU-120596. (A and B) Currents and histograms under 1 mM CLT ($n = 9$, $*p < 0.05$). (C and D) Currents induced by 1 mM IMI and the corresponding histograms ($n = 19$, $*p < 0.05$). (E and F) Currents and histograms representing currents elicited by 1 mM TMX ($n = 14$, $*p < 0.05$). (G and H) Currents elicited by 1 mM ACE and Histograms illustrating the increase under bath application of PNU-120596 ($n = 20$, $*p < 0.05$). In all case, histograms are mean \pm S.E.M. All compounds were applied during 20 s (black bars). Ctl: represents application of each compound without 1 μ M PNU in the bath.

functional receptors in *X. laevis* oocytes, we propose that expression of tick membranes could be used for further studies on the interactions between acaricide compounds and tick nAChRs. Indeed, in the present study, receptors retained their original functional properties and their dynamic regulation by specific receptor associated proteins or phosphorylation mechanism known to modulate insect nAChR function (Courjaret et al., 2003). The initial microtransplantation study was developed injecting AChRs and chloride channels from the electric organ of Torpedo into *X. laevis* oocytes (Marsal et al., 1995). Then, the same approach was applied by injecting vertebrate brain tissues, demonstrating that this method is very useful for screening and drug assay (Eusebi et al., 2009; Palma, 2011). Recently, enriched-nAChR membranes from the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* was expressed in the *X. laevis* oocytes which allowed the electrophysiological recordings of nicotine-, CLT- and TMX-evoked currents (Crespin et al., 2016).

5. Conclusion

Altogether, these data indicate that the microtransplantation of tick synganglion membranes is a powerful approach for studying nAChR pharmacology, and may constitute a first step in the development and testing of new acaricides.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. The contents of this review are solely the responsibility of the authors.

Acknowledgements

This work was granted in part by the Institut Carnot France Futur Elevage “Xenobio-Tick” and the “Screen-Robot” project (APR IA Région Centre Val de Loire). A. Le Mauff received a Ph.D grant from the French Department of Army (DGA: Direction Générale de l’Armement). H. Chouick received his master of science internship grant from the ANR Xenobio-Tick project. We are grateful to Ms. Guillot-Combe for her support. We are thankful for the help of G. Capron, A. Agoulon, N. de la Cotte, for the collect and the selection of ticks from the field, L. Simo for the training on tick dissections.

References

- Barbour, A.G., Benach, J.L., 2019. Discovery of the lyme disease agent. *mBio* 10.
- Bissinger, B.W., Donohue, K.V., Khalil, S.M., Grozinger, C.M., Sonenshine, D.E., Zhu, J., Roe, R.M., 2011. Synganglion transcriptome and developmental global gene expression in adult females of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Mol. Biol.* 20, 465–491.
- Cardenas-de la Garza, J.A., De la Cruz-Valadez, E., Ocampo-Candiani, J., Welsh, O., 2019. Clinical spectrum of Lyme disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 201–208.
- Cartereau, A., Martin, C., Thany, S.H., 2018. Neonicotinoid insecticides differently modulate acetylcholine induced currents on mammalian alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 175, 1987–1998.
- Collin, C., Hauser, F., Gonzalez de Valdivia, E., Li, S., Reisenberger, J., Carlsen, E.M., Khan, Z., Hansen, N.O., Puhm, F., Sondergaard, L., Niemiec, J., Heninger, M., Ren, G., Grimmelikhuijzen, C.J., 2013. Two types of muscarinic acetylcholine receptors in *Drosophila* and other arthropods. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3231–3242.
- Courjaret, R., Grolleau, F., Lapiéd, B., 2003. Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur. J. Neurosci.* 17, 2023–2034.
- Crespin, L., Legros, C., List, O., Tricoire-Leignel, H., Mattei, C., 2016. Injection of insect membrane in *Xenopus* oocyte: an original method for the pharmacological characterization of neonicotinoid insecticides. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 77, 10–16.

- Davies, A.R., Hardick, D.J., Blagbrough, I.S., Potter, B.V., Wolstenholme, A.J., Wonnacott, S., 1999. Characterisation of the binding of [³H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 38, 679–690.
- Egekwtu, N., Sonenshine, D.E., Bissinger, B.W., Roe, R.M., 2014. Transcriptome of the female synganglion of the black-legged tick *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with comparison between Illumina and 454 systems. *PLoS One* 9, e102667.
- Eusebi, F., Palma, E., Anici, M., Mileli, R., 2009. Microtransplantation of ligand gated receptor channels from fresh or frozen nervous tissue into *Xenopus* oocytes: a potent tool for expanding functional information. *Prog. Neurobiol.* 88, 32–40.
- Gulia-Nuss, M., Nuss, A.B., Meyer, J.M., Sonenshine, D.E., Roe, R.M., Waterhouse, R.M., Sattelle, D.B., de la Fuente, J., Ribeiro, J.M., Megy, K., Thimmapuram, J., Miller, J. R., Walenz, B.P., Koren, S., Hostetler, J.B., Thiagarajan, M., Joardar, V.S., Hannick, L.L., Bidwell, S., Hammond, M.P., Young, S., Zeng, Q., Abrudan, J.L., Almeida, F.C., Ayllon, N., Bhide, K., Bissinger, B.W., Bonzon-Kulichenko, E., Buckingham, S.D., Caffrey, D.R., Caimano, M.J., Croset, V., Driscoll, T., Gilbert, D., Gillespie, J.J., Giraldo-Calderon, G.L., Grabowski, J.M., Jiang, D., Khalil, S.M.S., Kim, D., Kocan, K.M., Koci, J., Kuhn, R.J., Kurtti, T.J., Lees, K., Lang, E.G., Kennedy, R.C., Kwon, H., Perera, R., Qi, Y., Radolf, J.D., Sakamoto, J.M., Sanchez-Gracia, A., Severo, M.S., Silverman, N., Simo, L., Tojo, M., Tornador, C., Van Zee, J. P., Vazquez, J., Vieira, F.G., Villar, M., Wespiser, A.R., Yang, Y., Zhu, J., Arensburg, P., Pietrantoni, P.V., Barker, S.C., Shao, R., Zdobnov, E.M., Hauser, F., Grimmelikhuijzen, C.J.P., Park, Y., Rozas, J., Benton, R., Pedra, J.H.F., Nelson, D.R., Unger, M.F., Tubio, J.M.C., Tu, Z., Robertson, H.M., Shumway, M., Sutton, G., Wortman, J.R., Lawson, D., Wikel, S.K., Nene, V.M., Fraser, C.M., Collins, F.H., Birren, B., Nelson, K.E., Caler, E., Hill, C.A., 2016. Genomic insights into the Ixodes scapularis tick vector of Lyme disease. *Nat. Commun.* 7, 10507.
- Hammond, J.B., Kruger, N.J., 1988. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.* 3, 25–32.
- Houchat, J.N., Dissanamossi, B.M., Landagaray, E., Mathé-Allainmat, M., Cartereau, A., Graton, J., Lebreton, J., Le Questel, J.Y., Thany, S.H., 2019. Mode of action of sulfoxafloer on α -bungarotoxin-insensitive nAChR1 and nAChR 2 subtypes: Inhibitory effect of imidacloprid. *Neurotoxicology* 74, 132–138.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 (Suppl. 1), S3–S14.
- Kalappa, B.I., Uteshev, V.V., 2013. The dual effect of PNU-120596 on $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor channels. *Eur. J. Pharmacol.* 718, 226–234.
- Lees, K., Jones, A.K., Matsuda, K., Akamatsu, M., Sattelle, D.B., Woods, D.J., Bowman, A. S., 2014. Functional characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Int. J. Parasitol.* 44, 75–81.
- Lees, K., Woods, D.J., Bowman, A.S., 2010. Transcriptome analysis of the synganglion from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Insect Mol. Biol.* 19, 273–282.
- Lindquist, L., 2008. Tick-borne encephalitis (TBE) in childhood. *Acta Paediatr.* 97, 532–534.
- Marsal, J., Tigyi, G., Mileli, R., 1995. Incorporation of acetylcholine receptors and Cl-channels in *Xenopus* oocytes injected with Torpedo electroplaque membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5224–5228.
- Miledi, R., Eusebi, F., Martinez-Torres, A., Palma, E., Trettel, F., 2002. Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection of human brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13238–13242.
- Millar, N.S., Gotti, C., 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56, 237–246.
- Murenzi, E., Toltin, A.C., Symington, S.B., Morgan, M.M., Clark, J.M., 2017. Evaluation of microtransplantation of rat brain neurolemma into *Xenopus laevis* oocytes as a technique to study the effect of neurotoxicants on endogenous voltage-sensitive ion channels. *Neurotoxicology* 60, 260–273.
- Palma, E., Trettel, F., Fucile, S., Renzi, M., Mileli, R., Eusebi, F., 2003. Microtransplantation of membranes from cultured cells to *Xenopus* oocytes: a method to study neurotransmitter receptors embedded in native lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2896–2900.
- Taillebois, E., Cartereau, A., Jones, A.K., Thany, S.H., 2018. Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 151, 59–66.
- Tan, J., Galligan, J.J., Hollingworth, R.M., 2007. Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *Neurotoxicology* 28, 829–842.
- Thany, S.H., 2009. Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *Neurotoxicology* 30, 1045–1052.
- Thany, S.H., 2011. Thiamethoxam, a poor agonist of nicotinic acetylcholine receptors expressed on isolated cell bodies, acts as a full agonist at cockroach cercal afferent/giant interneuron synapses. *Neuropharmacology* 60, 587–592.
- Thany, S.H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D.B., Lapiéd, B., 2007. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 14–22.
- Tomizawa, M., Zhang, N., Durkin, K.A., Olmstead, M.M., Casida, J.E., 2003. The neonicotinoid electronegative pharmacophore plays the crucial role in the high affinity and selectivity for the *Drosophila* nicotinic receptor: an anomaly for the nicotinic cation- π interaction model. *Biochemistry* 42, 7819–7827.

Annexe 3 : Effect of DEET and flupyradifurone on the tick *Ixodes ricinus*:
Repellency bioassay and pharmacological characterization by
microtransplantation of synganglion membranes (en cours de soumission)

Effect of DEET and flupyradifurone on the tick *Ixodes ricinus*: Repellency bioassay and pharmacological characterization by microtransplantation of synganglion membranes.

Anaïs Le Mauff¹, Olivier Plantard², Emiliane Taillebois¹, Steeve H. Thany¹

¹LBLGC USC INRAE 1328, Université d'Orléans, 1 rue de Chartres, 45067 Orléans, France, ²INRAE, Oniris, BIOEPAR, 44307, Nantes, France.

*Corresponding author: Pr. Steeve H. Thany (steeve.thany@univ-orleans.fr)

Abstract

Ticks are worldwide spread arthropods, they can transmit numerous pathogens as viruses, bacteria, protozoa, nematodes and thus constitute a major parasite group for animals and humans. In recent years, we observed an increase of tick-borne diseases incidence and the development of resistance to conventional acaricide. Thus, new control strategy is needed to fight against ticks, such as *Ixodes ricinus*. In the present study, we validate an original device to evaluate the repellent effect of compounds. We observed that DEET 10% and Flupyradifurone (FLU) at 10% or 20% were not able to have a repellent effect, whereas avoidance behavior was shown with higher concentration of DEET (20%). Interestingly, the combination of DEET 10% and FLU 10% has a significant synergistic effect on ticks' behavior. Using membrane microtransplantation we shown that DEET did not have an agonist effect but rather an inhibitory action on agonist-induced current. FLU acts in a different way, as it was able to have agonist action but did not present any modulatory effect on ACh or Nic induced currents. The combination of DEET 10% and FLU 10% has the same effect to that obtained with DEET alone on the Nic-induced response. Thus, we deduced that FLU did not bring any additional effect that could impact the response to Nic.

1. Introduction

Ticks are worldwide spread arthropods, they can transmit numerous pathogens as viruses, bacteria, protozoa, nematodes and thus constitute a major parasite group for animals and humans (Stuen, Granquist, and Silaghi 2013b; Egyed et al. 2012; Lindquist 2008). Ticks are parasites known to be harmful vectors of various tick-borne diseases for veterinary and human public health (Jongejan and Uilenberg 2004). In Europe, the forest tick *Ixodes ricinus* can transmit pathogens, which can lead to the development of tick-borne diseases such as Lyme borreliosis or tick-borne encephalitis (Lindquist 2008; Rizzoli et al. 2011; Barbour and Benach 2019) and can generate various health issues like neurogenerative, or arthritic disorders (Cardenas-de la Garza et al. 2019). The increase of tick-borne diseases diagnosed over the past years is a real public health issue and research of better acaricide or tick repellent compounds is needed to limit tick biting that led to the transmission of tick-borne diseases.

For human protection, the DEET (N,Ndiethyl-methyl-m-toluamide) is often the main compound present in formulation of insect and tick-repellents used on the skin (Bissinger and Roe 2010). This it is a reference when evaluating the efficiency of new repellent compounds. Since the 1950 to 1990 years, several compounds were used to fight against ticks due to their acaricidal effect, including pesticides from organochlorine, organophosphate, carbamate, formamide, pyrethroid, macrocyclic lactone, and phenylpyrazole families. These pesticides were mainly used to protect cattle from tick infestation and biting (Agwunobi, Yu, and Liu 2021). Pyrethroids, like deltamethrin or the permethrin, have significant repellent activity and were thus widely used in clothes impregnation for human protection (Katz, Miller, and Hebert 2008). Unfortunately, the intensive use of pesticide led to the development of resistance about 10 years after their first application for tick control. The resistance occurs more frequently in tropical or sub-tropical regions as Latin America, Australia and Africa, and for tick species that

Annexes

have a single obligate host, such as *Rhipicephalus microplus* (Abbas et al. 2014; Mekonnen et al. 2002). To counter the resistance phenomenon, one strategy developed is to use chemical mixtures in order to obtain synergistic effect and to limit resistance by multiplying the molecular targets of the compounds. This strategy also permits to use smaller quantity of molecules, what decrease the non-target toxic effect and the cost of application of these protection mixes. It was tested to increase the toxic effect of insecticides for pest species as *Acyrtosiphon pisum* (Taillebois et al. 2020), and for vector species like *Aedes aegypti* with the synergy of formamide with neonicotinoid and pyrethroid (Ahmed and Matsumura 2012), and for tick species as *Rhipicephalus sanguineus* for synergy between fipronil and amitraz (Prullage et al. 2011). Other neonicotinoids such as imidacloprid (IMI) was also successfully used in synergistic mixture to fight against tick such as *Ixodes holocyclus* (Burgh et al. 2017). Another strategy to deal with tick resistance is to develop new acaricide and repellent that have distinct mode of action than compounds already in the market. In this way, molecules acting on nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) seems particularly promising. Actually, few pesticides acting on nAChRs are currently used against tick. As an example, spinosad (an agonist of nAChRs) seems effective against resistant tick *Rhipicephalus microplus* (Miller et al. 2008) and, for instance, no resistance development to this pesticide was observed (George, Pound, and Davey 2004).

Flupyradifurone (FLU) is a new pesticide developed during 2010 years by Bayer CropScience and commercialized under the Sivanto® formulation name. FLU is a butanolide insecticide that act in a similar way than neonicotinoids by activation of acetylcholine nicotinic receptors (nAChRs) present in the central nervous system of arthropods and is described as a pesticide with a low toxicity for non-target species (Nauen, Jeschke, Velten, Beck, Ebbinghaus-Kintscher, et al. 2015). For now, little is known about the effect of this molecule on tick species. In this study, we developed behavioral assays to evaluate FLU repellent effect compared to

DEET. Using the membrane microtransplantation technics that we recently validated for compound screening (Le Mauff et al. 2020), we determine FLU and DEET effect on native nAChRs to better understand their mode of action. In addition, we determined the *in vivo* and *in vitro* effect of a mixture of DEET and FLU at low doses.

2. Materials and methods

2.1 Tick sample

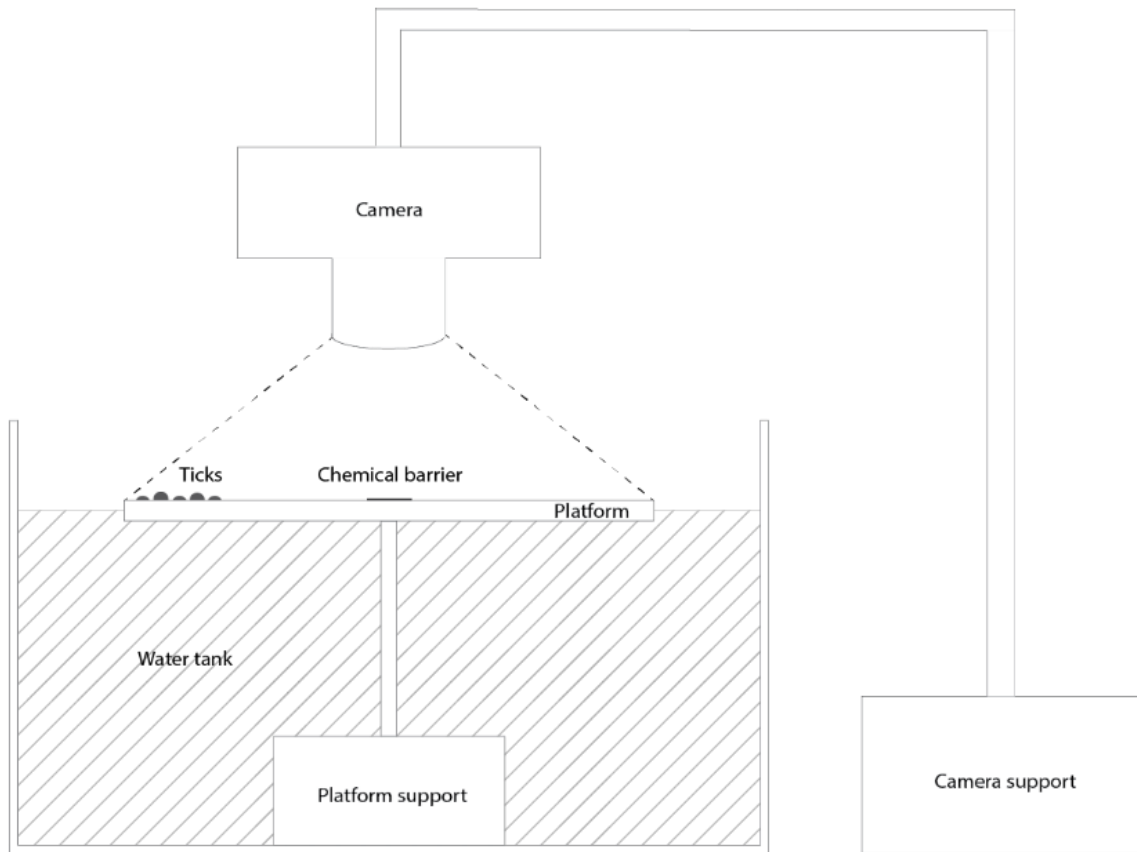
Female adult *Ixodes ricinus* were collected in the state forest of Chize, next to the CEBC laboratory (CNRS UMR 7372, Université de La Rochelle, Villiers-en-Bois, France) and provided by the BIOEPAR laboratory (INRAE, ONIRIS, Nantes, France). Female ticks were conserved at 4°C with enough moisture to slow down their life system and allow a longer survival of ticks. They were placed at room temperature 30min before the start of behavioral experiment.

2.2 Repellency bioassay

2.2.1 Experimental set-up

The tick repellency bioassay used in this study was inspired by Nchu team work (Nchu, Magano, and Eloff 2012) with some modifications. This bioassay was based on the exploration behavior of the *Ixodes ricinus* ticks. A polystyrene platform (20 x 5 cm) was fixed into a plastic container (L = 36.5 cm, W = 26.5 cm, H = 14 cm) and was completely surrounded by water (**Figure 1-A**). The platform was completely covered with a piece of protector paper (Sodipro, France) and a filter paper (Whatman No. 1, 1 cm x 5 cm) was fixed with a double-sided tape at the center of the platform (**Figure 1-B**). 7.5 μ L of the tested compound or solvent (absolute ethanol) were deposited on the filter paper and allowed to dry for 20 min to form the chemical barrier. Then, five ticks were put on one side of the platform (zone 1). Tick's movements are record during 30 min with a camera fixed above the device. For each group of ticks, a first round was performed with the solvent that corresponds to control condition. The second round of recording was done with either DEET or FLU, alone or in combination, at different concentration (10% or 20%). For each compound, between 6 to 10 groups were used (corresponding to 30 to 50 ticks).

A



B

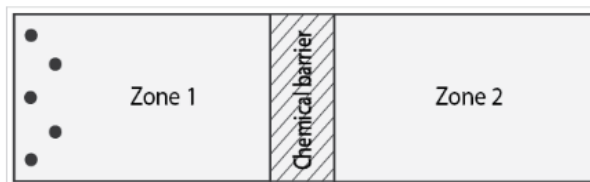


Figure 1: Description of video-tracking set-up used in repellent behavioral assays on ticks. (A) In front view, the platform, which is surrounded by water, is fixed in the center at the surface of the water tank. Half grey dots represent where ticks are released at the beginning of the video recording. The chemical barrier is put in the center of the platform and the camera is settled overhead of the platform that allows to record the entire tick movement over it. (B) With camera view, we can see the start zone, where ticks (grey dots) are put at the edge of the platform (zone 1), next the chemical barrier and then the last zone where ticks can go when they cross the barrier (zone 2).

2.2.2 Results analysis using ToxTrac software

ToxTrac is a software developed for Windows, which allows the tracking of several individuals in a video and was used to analysis the movement of ticks during experiments (Rodriguez et al. 2018; Rodriguez et al. 2017). For video analysis, three zones were drawn on the platform to define where tick started the experiment (zone 1), the filter paper in the center of the platform (chemical barrier) and the last zone (zone 2), where ticks can go if they cross the chemical barrier (**Figure 1-B**). Tick detection was calibrated with the size (15-300 pixels) and the contrast (55-80 intensity level). After analysis, the software notably provides the rate of presence inside the zone 2, the exploration rate, the total distance and the total time frozen performed by ticks during experiment (**Table 1**).

Table 1: Description of parameters used for the analysis (modified from the ToxTrac user guide, version 2.61)

| Parameter name | Description |
|--------------------------|--|
| Zone2 inside rate | (Inside Frame) / (Inside frame + Outside frame) |
| Exploration rate | (Number of explored areas) / (Total number of areas) |
| Total distance | Total distance covered by ticks, in mm |
| Total frozen Time | Total time where tick stayed in frozen state, in sec |
| Average speed | Average of instant speed ⁷ |
| Invisibility time | (Total time) – (time with visible tick) |

⁷ « Instant_Speed » (or S_i) s defined by the following formula (where c = « ana.space ») :

$$S_i^{arena,track} = \frac{\sqrt{(x_{i+c} - x_{i-c})^2 + (y_{i+c} - y_{i-c})^2}}{t_{i+c} - t_{i-c}}$$

2.3 Electrophysiological experiments

2.3.1 Synganglion membrane preparation

The membrane preparation from adult female tick synganglions was performed as described in Le Mauff et al. (2020). A pool of 150 synganglions were mechanically dissociated in 500 μ l of extraction buffer (50 mM Tris/HCl, 1 mM EGTA, 3 mM EDTA, supplemented with protease inhibitors) using a pellet Argos mixer (World Precision Instruments, Hertfordshire, UK). All experiments were conducted at 4°C. The solution was first centrifuged 1 min at 1500 rpm. The supernatant was collected in a new tube with 5 ml of extraction buffer, then homogenized and centrifuged at 15,000 rpm for 70 min. The pellet containing synganglion membranes was further concentrated using a sucrose gradient (7 ml of 20% sucrose and 5 ml of 50% sucrose, respectively), and centrifuged at 26,200 rpm, for 2 h 45 min. The membrane fraction located between 20% and 50% sucrose phase was supplemented with 20 ml of extraction buffer, then centrifuged at 26,200 rpm, for 50 min. The pellet was resuspended in 5 ml of glycine buffer, centrifuged 45 min at 26,200 rpm. Then, collected in 100 μ l of glycine buffer and stored at -80°C until use.

2.3.2 *Xenopus* oocytes preparation

Xenopus laevis oocytes were provided by CRB (University of Rennes 1, Rennes, France). The CRB Xenope is a French national platform dedicated to *X. laevis* breeding for experimental research. Oocytes were defolliculated according to Cartereau *et al.* (Cartereau, Martin, and Thany 2018), and were incubated in a standard oocyte saline (SOS) solution (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂ and 5 mM HEPES, pH 7.5) supplemented

Annexes

with antibiotics (50 mg/ml gentamycin, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 2.5 mM pyruvate). Defolliculated oocytes were microinjected with 50.6 nl of the tick membrane solution using a nanoliter injector (Nanoliter 2010, World Precision Instruments, Hertfordshire, UK) and were incubated in the SOS solution at 18°C during 24 h before electrophysiological measurements.

2.3.3 *Electrophysiological recording*

A two-electrodes voltage clamp technique was used to record neuronal receptor responses from *I. ricinus* synganglion membrane microtransplanted into xenopus oocytes. Electrodes were prepared with a glass puller (model P-97, Sutter Instrument) and filled with a 3 M KCl solution. Their resistance was controlled to be between 0.1 and 3 M Ω . After incubation, oocytes were placed in a recording chamber at room temperature (20 – 22°C), with a continuous flow of SOS supplemented with atropine and PNU-120596 (0.5 mM and 1 μ M respectively). Atropine inhibit muscarinic acetylcholine receptors responses to selectively record the nAChR responses. PNU-120596 is used to enhance the current amplitudes (Le Mauff et al. 2020). A Digidata-1322A (Axon Instruments) A/D converter was used to make the recordings which were analyzed with pCLAMP 10 (Molecular Devices, Union City, CA, USA). The oocyte membrane potential was hold at -60 mV and perfusion for each molecule tested was performed during 20 sec with a flow rate of 5mL/min. The pre-treatment of DEET or FLU was applied during 15min before the application of agonist. Three pre-treatment conditions were tested: 1) DEET alone, 2) FLU alone and 3) combination of DEET and FLU. After the application of each molecule, oocytes were washed with a continuous flow of SOS with atropine and PNU-120596, during 5 min.

Annexes

2.4 Drugs

ACh, nicotine, atropine, PNU-120956, DEET and flupyradifurone were purchased from Sigma (St Quentin, France). They were dissolved in the DMSO at a final concentration of 0.01% DMSO for the electrophysiological recordings. DEET and flupyradifurone were dissolved in absolute ethanol for the repellent bioassay.

2.5 Statistical analysis

Parameters used for the behavior study (zone 2 inside rate, exploration rate, total distance) were normalized using the mean of values obtained with control groups. Differences between normalized control and normalized test group were analyzed using One tailed Wilcoxon paired test (samples < 30). Data were shown as mean \pm SEM and analyzed using Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

For the electrophysiological results, currents were normalized using the mean current amplitudes under the same control conditions (I/I_{mean}). Data were shown as mean \pm SEM and analyzed using Prism 7. Differences between normalized currents from control and experimental groups were analyzed using one-way Anova and One tailed Wilcoxon paired test (samples < 30), using Prism 7. The IC50 values for ACh and nicotine were determined using nonlinear regression on normalized data (1 mM ACh or nicotine as maximal response) using Prism 7. The dose–response curves were derived from the fitted curve following the equation: $Y = I_{\text{min}} + (I_{\text{max}} - I_{\text{min}})/(1 + 10(\log(\text{IC}_{50}-X))^H)$ where Y is the normalized response, I_{max} and I_{min} are the maximum and minimum responses, H is the Hill coefficient, IC50 is the concentration giving half the maximum response and X is the logarithm of the compound concentration. In all experiments, ‘n’ represents the number of recorded oocytes.

3. Results

3.1 Repellent effect of DEET on the tick *Ixodes ricinus*

During experiments, two concentrations of DEET were tested to observe their repellent effect on ticks. With DEET at 10%, the trajectory of the ticks seems to be slightly modified as if they avoid to walk on the filter impregnated with DEET (**Figure 2 A and B**). However, after statistical analysis, no significant differences were found for the zone 2 inside rate (**Figure 2 C**, $n=50$, $p = 0.0654$), the exploration rate, the total distance and average speed of ticks (**Figure 2, D-G**, $n=50$, $p > 0.05$). These results demonstrate that tick behavior is not modified in the presence of DEET 10%. Finally, the total time frozen is not different between control and DEET 10%, indicating the absence of experimental bias (**Figure 2 H**, $n=50$, $p > 0.05$).

When testing DEET 20%, we first observed avoidance behavior in the trajectory of ticks (**Figure 3 A and B**). In the presence of ethanol, ticks demonstrated movements on the whole platform (**Figure 3 A**), what was not the case in the presence of DEET 20% (**Figure 3 B**). The zone 2 inside rate showed a significant decrease of 75% in the presence of DEET 20% (**Figure 3 C**, $n=45$, $*p < 0.05$) and the exploration rate decrease by 50%. The total distance and average speed were also significantly less important in the presence of DEET 20%, about 53% and 45% lower, respectively (**Figure 3 E and G**, $n=45$, $*p < 0.05$). The total time frozen and invisible time are not modified, what validate experimental conditions (**Figure 3 F and H**, $n=45$, $p > 0.05$).

These results demonstrated that DEET 20% has a repellent effect on the tick *I. ricinus*. This is in accordance with literature and allowed us to validate our experimental procedure.

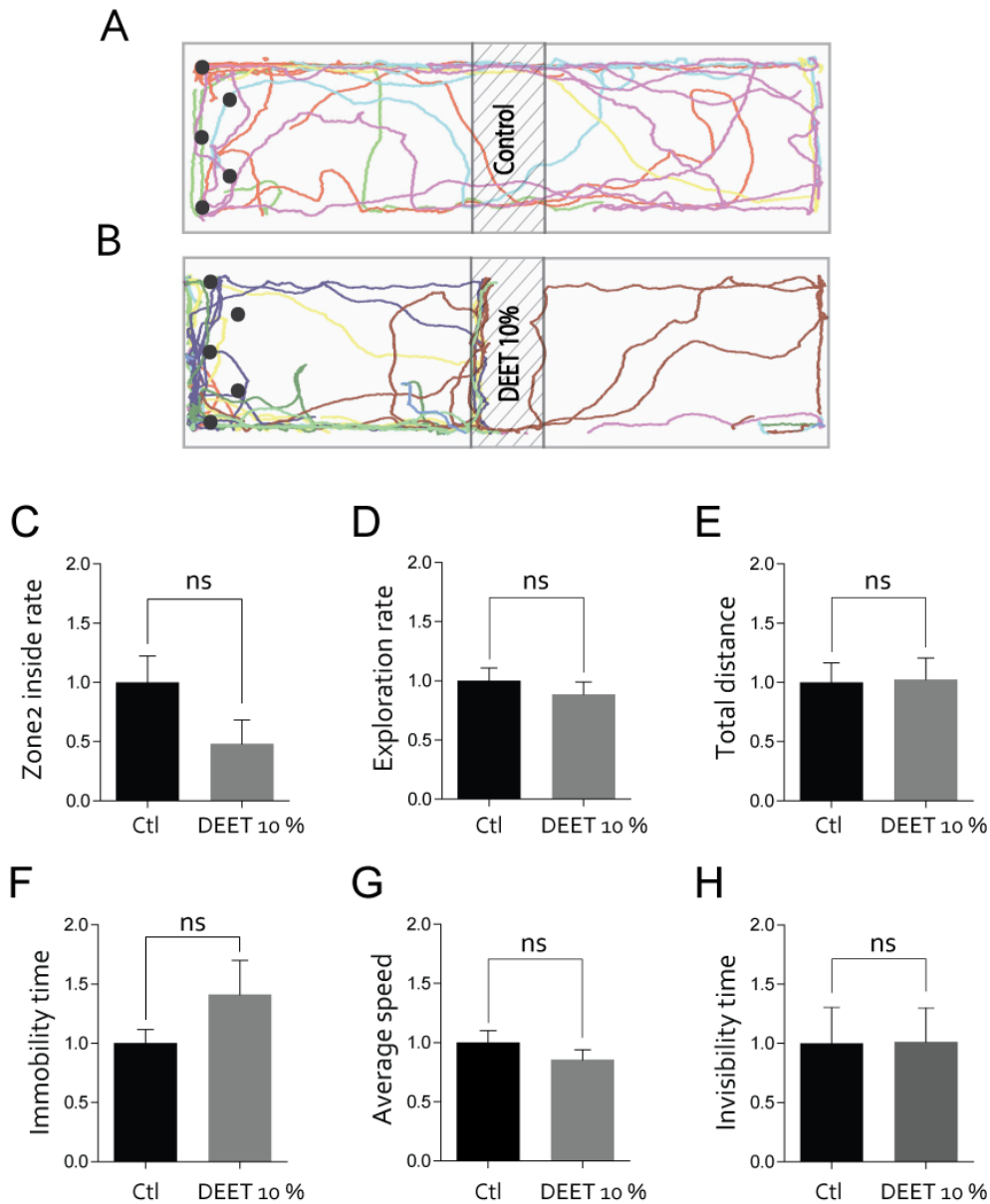


Figure 2. Repellent effect of DEET 10% on the tick *Ixodes ricinus*. (A and B) Captures represented tick movement tracking during the video recording with (A) ethanol for the control and (B) 10% DEET. (C, D, E, F) Histograms represented the difference between the control (black bars) and DEET (grey bars) for the different parameters. Data are normalized by the mean of the control values. $n = 50$. Histograms represent mean \pm S.E.M, $\alpha = 0.05$; significant differences are marked with *, ns corresponds to not significant.

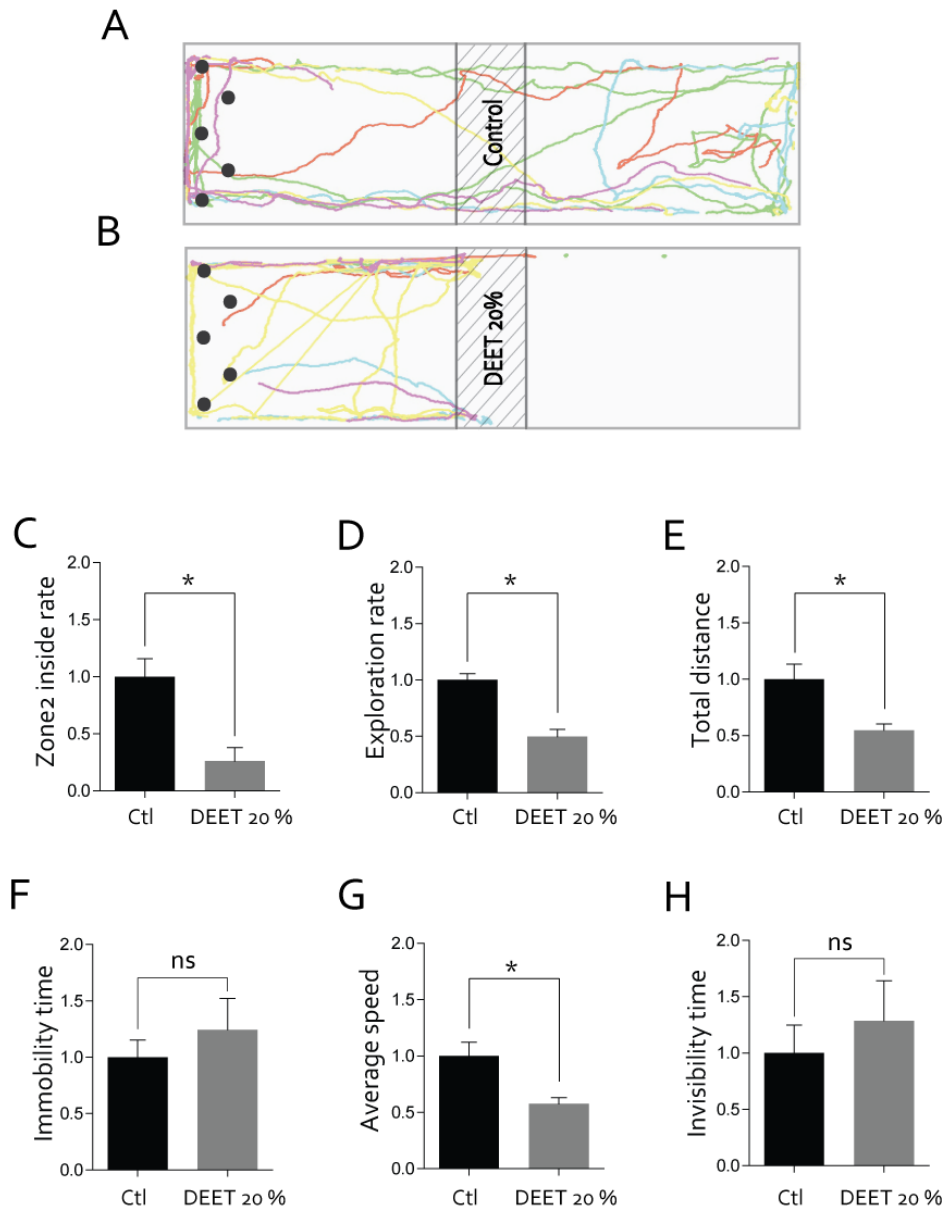


Figure 3. Repellent effect of DEET 20% on the tick *Ixodes ricinus*. (A and B) Captures represented tick movement tracking during the video recording with (A) ethanol for the control and (B) 20% DEET. (C, D, E, F) Histograms represented the difference between the control (black bars) and DEET (grey bars) for the different parameters. Data are normalized by the mean of the control values. $n = 50$. Histograms represent mean \pm S.E.M, $\alpha = 0.05$; significant differences are marked with *, ns corresponds to not significant.

3.2. Repellent effect of flupyradifurone on the tick *Ixodes ricinus*

With the FLU 10%, no difference was visually observed on the trajectory of the ticks compared to control conditions (**Figure 4 A and B**). In addition, the tick trace showed that ticks went through the chemical barrier without any avoidance caused by the molecule. In correlation with this result, no significant differences were found for zone 2 inside rate, exploration rate, total distance and average speed (**Figure 4 C, D, E and G**, n=30, $p > 0.05$). As for previous experiments, we verified that total frozen time and invisibility time were not different between control and FLU 10% (**Figure 4 F and H**, n=30, $p > 0.05$).

When FLU was tested at higher concentration (20%) no modification were observed compared to control. The platform was extensively explored by ticks both in the presence of ethanol or FLU 20% (**Figure 5 A and B**). The different parameters measured: zone 2 inside rate, exploration rate, total distance and average speed were not different in the presence of FLU 20% (**Figure 5 C, D, E and G**, n=30, $p > 0.05$). The experimental data were validated as total time frozen and invisible time were also similar between control and FLU 20% conditions (**Figure 5 F and H**, n=30, $p > 0.05$). These results demonstrates that FLU alone is unable to have a repellent effect on the tick *I. ricinus*.

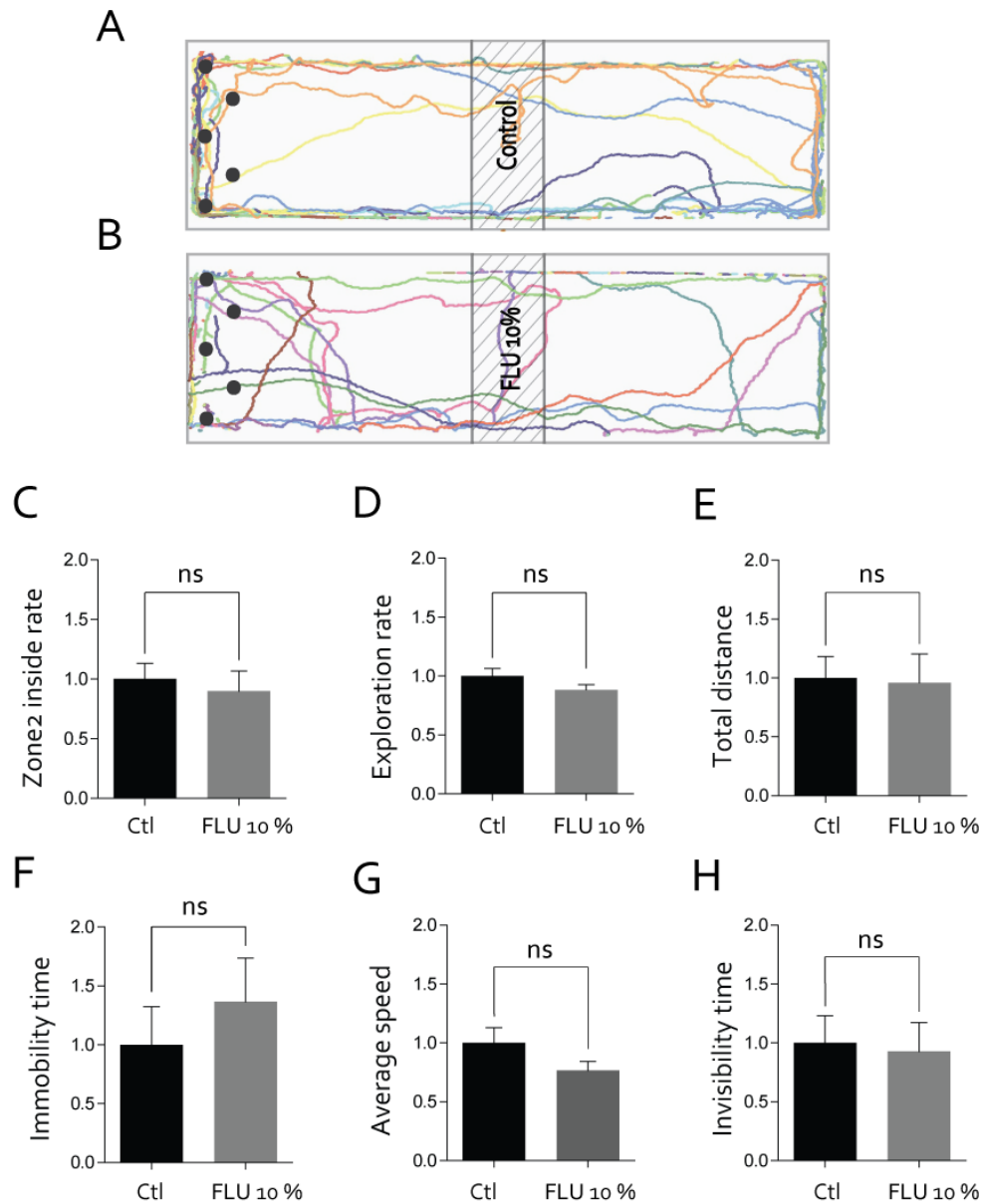


Figure 4. Repellent effect of flupyradifurone (FLU) 10% on the tick *Ixodes ricinus*. (A and B) Captures represented tick movement tracking during the video recording with (A) ethanol for the control and (B) 10% FLU. (C, D, E, F) Histograms represented the difference between the control (black bars) and FLU (grey bars) for the different parameters. Data are normalized by the mean of the control values. $n = 30$. Histograms represent mean \pm S.E.M, $\alpha = 0.05$; significant differences are marked with *, ns corresponds to not significant

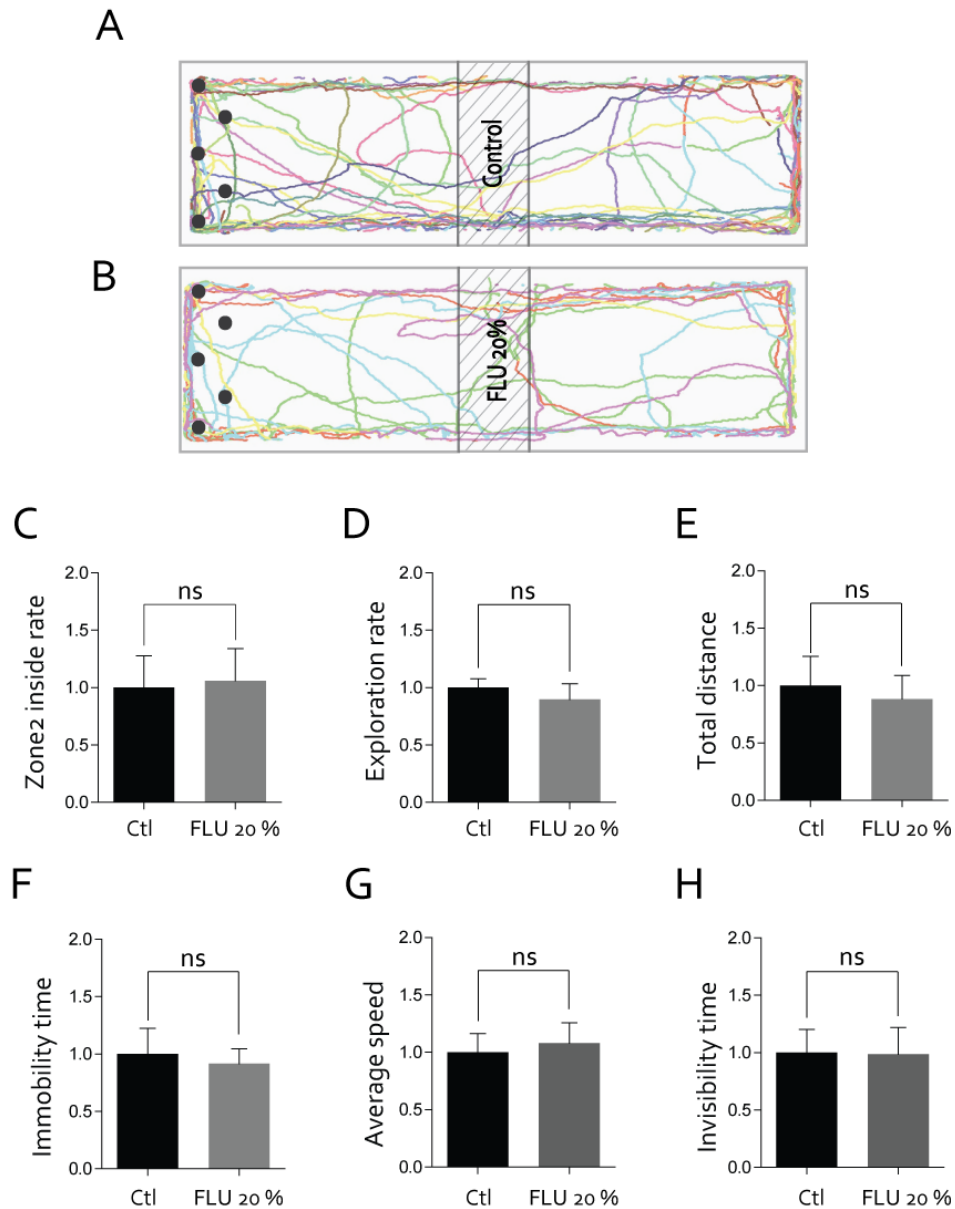


Figure 5. Repellent effect of flupyradifurone (FLU) 20% on the tick *Ixodes ricinus*. (A and B) Captures represented tick movement tracking during the video recording with (A) ethanol for the control and (B) 20% FLU. (C, D, E, F) Histograms represented the difference between the control (black bars) and FLU (grey bars) for the different parameters. Data are normalized by the mean of the control values. $n = 30$. Histograms represent mean \pm S.E.M, $\alpha = 0.05$; significant differences are marked with *, ns corresponds to not significant.

3.3. *Repellent effect of DEET and flupyradifurone used as a mixture*

With DEET 10% and FLU 10% were used as a mixture, we first observed the repellent effect on the trajectory of ticks. Actually, tick trajectory illustrated in **Figure 6 B** clearly demonstrated that the combination DEET 10% + FLU 10% act as a chemical barrier against ticks, compared to control condition (**Figure 6 A**, $n=30$, $*p < 0.05$). This modification of tick movements is confirmed by the decrease of zone 2 inside rate of 88% ($n=30$, $*p < 0.05$, Figure 6 C) and of the exploration rate of 30% (**Figure 6 D**, $n=30$, $*p < 0.05$). The total distance and average speed are also lower in the presence of the mixture (**Figure 6 E and G**, $n=30$, $*p < 0.05$). We also verified that frozen time and invisibility time are similar in control and with the mixture DEET 10% + Flu 10% (**Figure 6 F and H**, $n=30$, $p > 0.05$). These results demonstrated the high synergism effect of the combination of DEET and FLU used at low doses (10%).

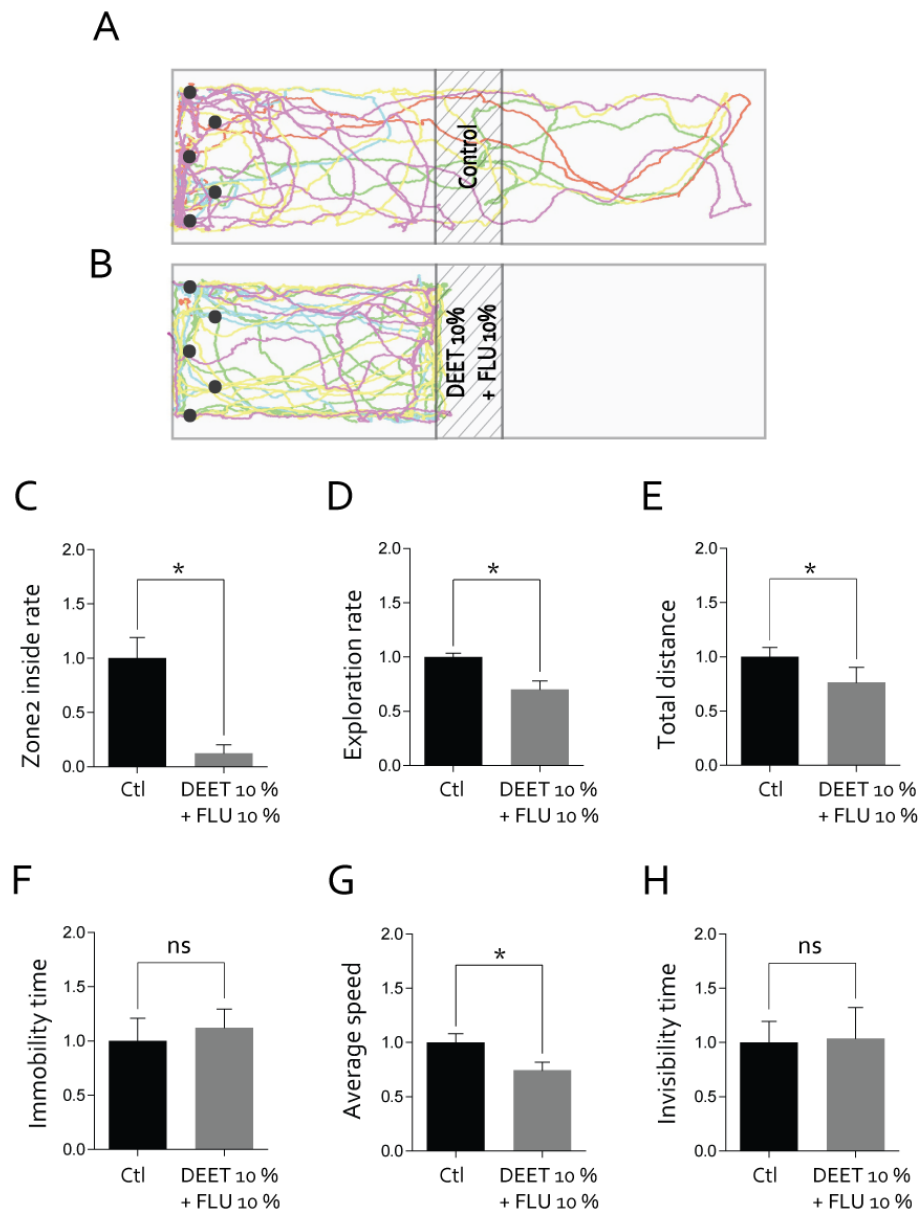


Figure 6. Repellent effect of the mixture DEET 10% + FLU 10% on the tick *Ixodes ricinus*. (A and B) Captures represented tick movement tracking during the video recording with (A) ethanol for the control and (B) DEET 10%/FLU 10%. (C, D, E, F) Histograms represented the difference between the control (black bars) and FLU (grey bars) for the different parameters. Data are normalized by the mean of the control values. n = 30. Histograms represent mean \pm S.E.M, $\alpha = 0.05$; significant differences are marked with *, ns corresponds to not significant

3.4. Electrophysiological recording

For this study, the effects of DEET and FLU on microtransplanted nAChRs from synganglion membranes were evaluated. The currents induced by ACh (1 mM) and Nic (1 mM) were first tested to validate the expression of functional nAChRs in oocyte (**Figure 7 A and B**). With DEET (1mM), no current was observed demonstrating that DEET did not have an agonist effect (**Figure 7 C**, n=6). When FLU (1 mM) was applicated an induced current of -78.8 ± 25 nA was observed (**Figure 7 D**, n=6). The dose response curves show that the EC50 determined are 276 μ M for ACh, 149 μ M for Nic and 521 μ M for FLU (**Figure 7 E**, n=6). This result is in accordance with the action of FLU as agonist of nAChRs.

To evaluate the modulatory effect of the compounds, we tested the effect of a pre-treatment on ACh- and Nic-induced currents. Pre-treatment of FLU alone (5 nM) does not modify ACh-induced current (**Figure 12 B**, n = 6, $p > 0,05$) or Nic-evoked current (**Figure 8 E**, n = 8, $p > 0,05$). On the contrary, DEET applied as a 5 nM bath is able to inhibit Nic-induced response by 45% (**Figure 8 D**, n = 7, $*p < 0,05$), but does not have any effect on the ACh-induced response (**Figure 8 A**, n = 9, $p > 0,05$). The bath application of combination of the two molecules shows an inhibition on the Nic-evoked response by 46% (**Figure 8 F**, n = 7, $*p < 0,05$), but not on the ACh-induced current (**Figure 8 C**, n = 8, $p > 0,05$). Thus, an antagonist effect from the DEET was observed on the 1 mM Nic-induced response only. The antagonist effect of the mixture observed could correspond to an additive effect due to the presence of DEET.

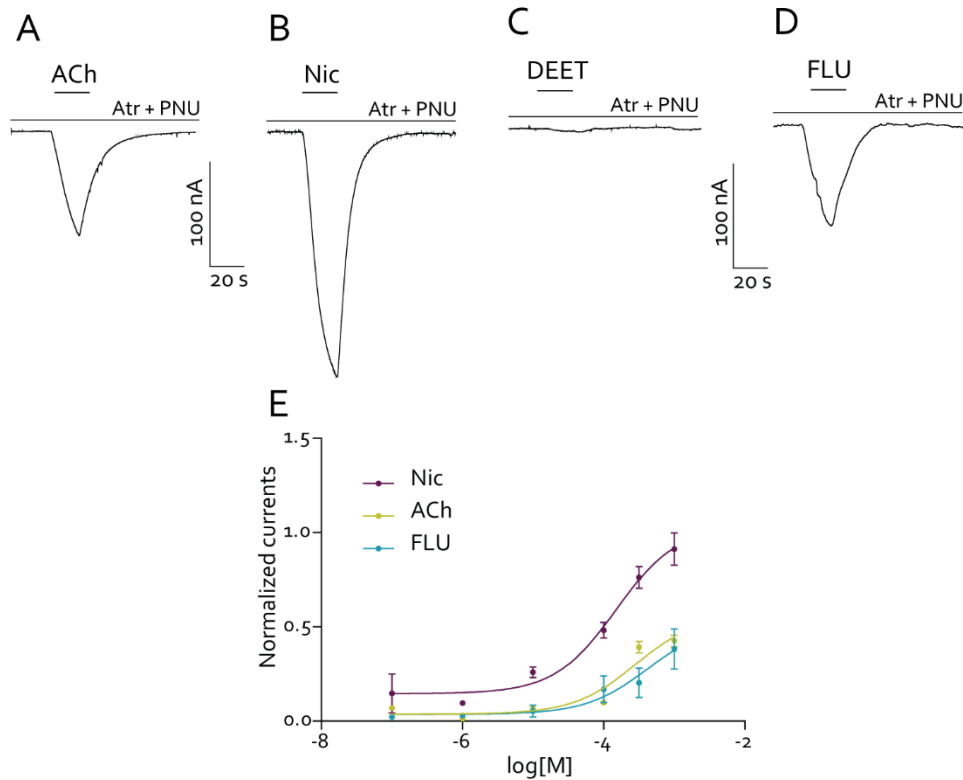


Figure 7. Study of several agonists-induced current as ACh, Nic, compared to two pesticides such as DEET- and FLU-evoked responses, on oocyte microtransplanted with purified synganglion membrane. (A) example of 1 mM ACh-induced current. (B) Example of 1 mM Nic-evoked current. (C) Example of 1 mM DEET-evoked response. (D) Example of 1 mM FLU-induced response. For all illustrated currents, horizontal bar represents the compound application, and the perfusion time was 20 sec. (E) ACh, Nic and FLU concentration-current response relationships from $n = 15$, in the presence of $0.5 \mu\text{M}$ atropine and $1 \mu\text{M}$ PNU-120596. Each point represents peak currents normalized to the I_{max} of 1 mM ACh.

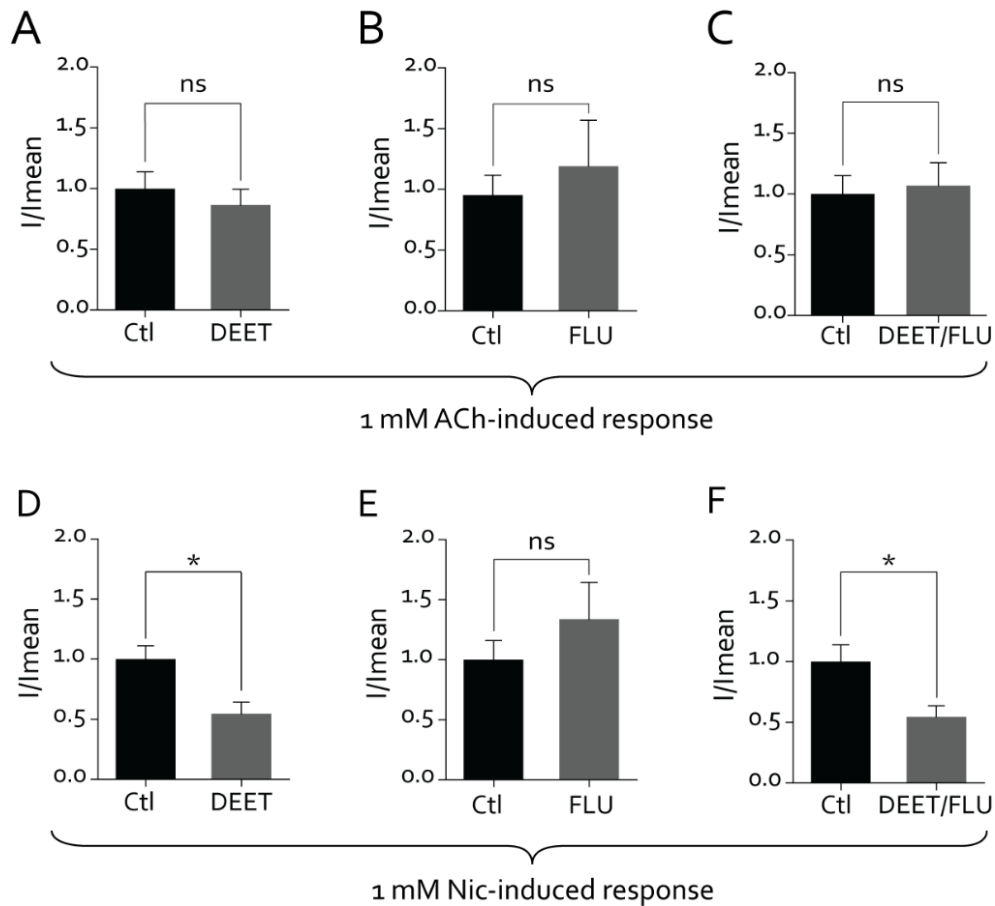


Figure 8. Effect of 5 nM DEET and 5 nM FLU pre-treatment on ACh- and Nic-evoked current. (A) Histograms illustrate the comparison between ACh without 5 nM DEET (Ctl) or with 5 nM DEET, $n=9$, $p > 0,05$, ns = no significant. (B) Histograms illustrate the comparison between ACh without 5 nM FLU (Ctl) or with 5 nM FLU, $n=6$, $p > 0,05$, ns = no significant. (C) Histograms illustrate the comparison between ACh without 5 nM DEET/FLU (Ctl) or with 5 nM DEET/FLU, $n=8$, $p > 0,05$, ns = no significant. (D) Histograms illustrate the comparison between Nic without 5 nM DEET (Ctl) or with 5 nM DEET, $n=9$, $*p < 0,05$, * = significant difference. (E) Histograms illustrate the comparison between Nic without 5 nM FLU (Ctl) or with 5 nM FLU, $n=8$, $p > 0,05$, ns = no significant. (F) Histograms illustrate the comparison between Nic without 5 nM DEET/FLU (Ctl) or with 5 nM DEET/FLU, $n=8$, $*p < 0,05$, * = significant difference. Each histogram represents mean \pm S.E.M, and the perfusion time was 20 s.

4. Discussion

4.1 Effect of flupyradifurone, alone or in combination with DEET

The behavioral test was used to test the repulsive effect of FLU, belonging to the butenolide family, on adult female ticks. Despite the neurotoxic effect of this compound observed in native nAChRs microtransplantation experiments, the behavior of *Ixodes ricinus* ticks, over a short period of exposure, does not show strong changes for both tested concentrations. We also found that the use of 10% DEET did not alter the exploration behavior of the platform by ticks. Therefore, we chose to test a mixture between DEET (repellent) and FLU (neurotoxic pesticide) with the hypothesis of observing a synergistic effect of the mixture on the behavior of exposed ticks. The objective of using a combination of molecules is to obtain a repulsive effect on the behavior of ticks by using the smallest amount of molecule. We observed that 10% FLU has a significant repellent effect when used in mixture with 10% DEET while taken independently it has no effect on the behavior of the tick. These results thus highlight a synergistic effect of the DEET + FLU 10% mixture.

The observed repellent effect is superior to that obtained with the 20% DEET, which serves as a reference. This combination could represent a potential alternative in the fight against ticks. Since FLU has no repellent effect at any concentration tested, this suggests that it acts as a potentiator of DEET. Moreover, a recent study on the mode of repellent action of the combination of transfluthrin (pyrethroid) and DEET on mosquitoes (*Aedes aegypti*) showed that presence of a low concentration of the pesticide (that does not show any repellent effect alone) could have a positive synergistic effect on the repulsive activity of DEET (Andreazza et al. 2021). Thus, the research on the combination effect between repellent substance and agonist compound of neuronal targets could be interesting, in order to obtain a better chemical protection. This strategy would allow to reduce the doses of compounds used and thus to reduce

the development of resistance. Also, toxicity studies would be interesting to perform in order to observe the modulation made by the two substances on the toxic effect or not of each of the compounds.

*4.2 Validation of an original device for behavioral assays in the tick *Ixodes ricinus**

The study of tick avoidance behavior allows the testing of new *in-vivo* repellent compounds (Nchu, Magano, and Eloff 2016, 2012). These experiments are regularly performed on nymphs or adult ticks in small devices, such as petri dishes (Carroll et al. 2004; Ferreira et al. 2017). The device developed in this thesis allows to combine the study of the exploration behavior and the use of a larger device. The major advantage is to avoid saturation of the device with odorant molecules and to get as close as possible to the potential conditions of use. Another type of device, used to study the ascension behavior of ticks, is made in a similar way to ours, using a platform with a rod in its center allowing the ticks to ascend and be in contact with filter papers soaked with substances to be tested. This technique has been used on adult ticks of several species such as *Rhipicephalus pulchessus* (Zorloni, Penzhorn, and Eloff 2010), *Hyalomma rufipes* (Nchu, Magano, and Eloff 2016, 2012), or with larvae as in the case of *Ixodes ricinus* (Tabari et al. 2017).

The use of a horizontal platform made it possible to optimize the exploitation of the data with the use of ToxTrac software (Rodriguez et al. 2017; Rodriguez et al. 2018). Several parameters were selected in the tick's behavioral assays and those described in the figure are the most demonstrative of the trajectories, immobility and, exploration that the ticks performed during the experiments. Moreover, the parameter illustrating the time spent where the individuals were not visible to the camera allows to demonstrate that this phenomenon is not a bias because it does not show a significant difference between the control groups and those in

Annexes

the presence of the compounds (DEET, FLU alone or in combination). There is also no significant difference between the groups of the different solutions tested (Student T-test, $p > 0,05$). Results obtained for the 20% DEET concentration showed a significant repulsive effect, in agreement with data available in the literature (Katz, Miller, and Hebert 2008; Diaz 2016). Thus, the device is validated for the study of the repellent effect of substances on adult female ticks *I. ricinus*. It would be interesting to verify if the protocol can be adapted for other species of ticks and other stages of development, as well as to perform tests to determine the attractive potential of certain compounds such as pheromones, other chemical substances or plant extracts.

4.3 nAChRs sensitivity to DEET and FLU

Studies have been conducted on the CNS activity of DEET in different types of organisms. Thus, an EC₅₀ of 120 μ M was determined in the CNS of the fly *M. domestica* (Swale et al. 2014). Also, an inhibition of sodium channels caused by DEET was observed (IC₅₀ = 700 μ M) following the patch-clamp study of rat cortical neurons as well as the inhibition of potassium channels whose EC₅₀ is 6 times lower than that of Na⁺ channels (Swale et al. 2014). Another study showed that DEET, applied at low concentration (10 nM) on *P. americana* DUM neurons, is able to bind at allosteric binding site of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) and potentiate the anti-acetylcholine action of a carbamate, the propoxur (Abd-Ella et al. 2015). DEET would have a positive allosteric modulation effect on the mAChRs of cockroach DUM neurons, which would increase intracellular calcium levels following the activation of mAChRs (Abd-Ella et al. 2015; Corbel, Stankiewicz, Pennetier, Fournier, Stojan, Girard, Dimitrov, Molgó, et al. 2009). In our study, pre-treatment with a low concentration of DEET (5 nM) resulted in an inhibition of Nic-induced currents. However, no

Annexes

effect was observed on ACh-induced currents. The conclusion regarding the action of DEET on the receptors present in the membrane extracts microtransplanted in oocytes is not easy to establish. In fact, the presence of some native receptor regulators may influence the responses obtained after the pre-treatments, probably by interacting with the molecules applied to the oocytes (Eusebi et al. 2009).

Compared to DEET activity, flupyradifurone showed an agonistic effect at 1 mM. In contrast, experiments performed with the application of low doses of flupyradifurone (5 nM) at the level of oocytes showed no effect. This could indicate that there is no allosteric effect of this new pesticide at the level of the nAChRs studied in the tick *I. ricinus*. This molecule has been described as neurotoxic in several insect species, in particular by toxicity experiments conducted on *Anopheles* larvae of the species *A. darlingi* (LC50 = 1.18 µg/mL at 48h exposure for commercial flupyradifurone), (da Silva Mesquita et al. 2020). Another 2015 study allows the observation of the sensitivity of insect nAChRs through affinity binding studies on fly *M. domestica* head membrane preparations, as well as electrophysiological measurements on neurons isolated from *Spodoptera frugiperda* (Nauen, Jeschke, Velten, Beck, Ebbinghaus-Kintscher, et al. 2015).

When DEET and flupyradifurone (5 nM solution) were applied together, a similar inhibition to that obtained with DEET alone was found on the Nic-induced response. Thus, we deduced that this effect was only due to the presence of DEET in the solution and that flupyradifurone did not bring any additional effect that could impact the response to Nic. The use of two or more molecules with neurotoxic character in combination is often used in order to obtain the same neurotoxic effect or to increase it with the combinations of molecules, using the least active product possible (Brindley and Selim 1984). The synergy between several compounds has been studied in several species at the toxicological level, particularly to overcome the insect resistance to mainly used pesticides. For example, on insect disease

Annexes

vectors, as for larvae of *Aedes aegypti* the combination of formamides with pyrethroid or neonicotinoid was studied, and in *Culex quinquefasciatus* the combination of carbamate and pyrethroid was investigated (Ahmed and Matsumura 2012; Corbel et al. 2004). This type of study has also been conducted on crop pest such as for in the striped moth *Spodoptera litura* where the combination of pyrethroids with organophosphates and, phenylpyrazole has been studied, or for the pea aphid *A. pisum* where several pesticides were tested in combination with a quinuclidine borane complex analogue (Taillebois et al. 2020; Ahmad, Saleem, and Sayyed 2009). For these insects, the control method is often composed of preventive treatments leading to the development of resistance due to the application of a high dose of a single pesticide. The combination of DEET and flupyradifurone showed no difference compared to the use of DEET alone at low concentration. Nevertheless, it could be interesting to use DEET in low concentration combined with the use of flupyradifurone as an agonist in order to observe if there is or not a positive modulation effect of DEET on the response induced by flupyradifurone.

5. Conclusion

The present study combined an original behavioral assay to the recent improved technique of membrane microtransplantation. This integrative approach revealed to be particularly relevant for the evaluation of *in-vivo* repellent effect and its correlation with compounds mode of action at the molecular level. In this work, we determined that FLU alone is not able to have *in-vivo* repellent effect on ticks even though it could have agonist effect on nAChRs. Interestingly, FLU and DEET revealed to have synergistic effect both *in-vivo* and on nAChRs. Thus, the use of such combination could be a promising strategy to fight against ticks, in particular acaricide-resistant populations.

References

- Abbas, R. Z., M. A. Zaman, D. D. Colwell, J. Gilleard, and Z. Iqbal. 2014. 'Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play', *Vet Parasitol*, 203: 6-20.
- Abd-Ella, A., M. Stankiewicz, K. Mikulska, W. Nowak, C. Pennetier, M. Goulu, C. Fruchart-Gaillard, P. Licznar, V. Afaire-Marchais, O. List, V. Corbel, D. Servent, and B. Lapied. 2015. 'The Repellent DEET Potentiates Carbamate Effects via Insect Muscarinic Receptor Interactions: An Alternative Strategy to Control Insect Vector-Borne Diseases', *PLoS One*, 10: e0126406.
- Agwunobi, Desmond O, Zhijun Yu, and Jingze Liu. 2021. 'A retrospective review on ixodid tick resistance against synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation', *Pesticide Biochemistry and Physiology*: 104776.
- Ahmad, Munir, Mushtaq Ahmed Saleem, and Ali H Sayyed. 2009. 'Efficacy of insecticide mixtures against pyrethroid-and organophosphate-resistant populations of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)', *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 65: 266-74.
- Ahmed, M.A.I., and F. Matsumura. 2012. 'Synergistic Actions of Formamidine Insecticides on the Activity of Pyrethroids and Neonicotinoids Against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)', *Journal of Medical Entomology*, 49: 1405-10.
- Andreazza, Felipe, Wilson Valbon, Qiang Wang, Feng Liu, Peng Xu, E. Bandason, Mengli Chen, Shaoying Wu, Leticia Smith, Jeffrey Scott, Youfa Jiang, Dingxin Jiang, Aijun Zhang, Eugenio Oliveira, and Ke Dong. 2021. 'Sodium channel activation underlies transfluthrin repellency in *Aedes aegypti*', *PLoS neglected tropical diseases*, 15: e0009546.
- Barbour, A. G., and J. L. Benach. 2019. 'Discovery of the Lyme Disease Agent', *MBio*, 10.
- Bissinger, Brooke W, and R Michael Roe. 2010. 'Tick repellents: past, present, and future', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96: 63-79.
- Brindley, W. A., and A. A. Selim. 1984. 'Synergism and Antagonism in the Analysis of Insecticide Resistance', *Environmental Entomology*, 13: 348-54.
- Burgh, S de, Kasia Hunter, Chrissie Jackson, Michael Chambers, Corinna Klupiec, and Veronica Smith. 2017. 'Repellency effect of an Imidacloprid/flumethrin (Seresto®) controlled release polymer matrix collar against the Australian paralysis tick (*Ixodes holocyclus*) in dogs', *Parasitology Research*, 116.
- Cardenas-de la Garza, J. A., E. De la Cruz-Valadez, J. Ocampo-Candiani, and O. Welsh. 2019. 'Clinical spectrum of Lyme disease', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38: 201-08.
- Carroll, J. F., V. B. Solberg, J. A. Klun, M. Kramer, and M. Debboun. 2004. 'Comparative Activity of Deet and AI3-37220 Repellents Against the Ticks *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in Laboratory Bioassays', *Journal of Medical Entomology*, 41: 249-54.

Annexes

- Cartereau, A., C. Martin, and S. H. Thany. 2018. 'Neonicotinoid insecticides differently modulate acetylcholine-induced currents on mammalian alpha7 nicotinic acetylcholine receptors', *Br J Pharmacol*, 175: 1987-98.
- Corbel, Vincent, Michel Raymond, Fabrice Chandre, Frédéric Darriet, and Jean-Marc Hougard. 2004. 'Efficacy of insecticide mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say)(Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates', *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 60: 375-80.
- Corbel, Vincent, Maria Stankiewicz, Cédric Pennetier, Didier Fournier, Jure Stojan, Emmanuelle Girard, Mitko Dimitrov, Jordi Molgó, Jean-Marc Hougard, and Bruno Lapied. 2009. 'Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet', *BMC biology*, 7: 1-11.
- da Silva Mesquita, Rochelly, Andrii Kyrylchuk, Iryna Grafova, Denys Kliukovskyi, Andriy Bezdudnyy, Alexander Rozhenko, Wanderli Pedro Tadei, Markku Leskelä, and Andriy Grafov. 2020. 'Synthesis, molecular docking studies, and larvicidal activity evaluation of new fluorinated neonicotinoids against *Anopheles darlingi* larvae', *PLoS One*, 15: e0227811.
- Diaz, J. H. 2016. 'Chemical and Plant-Based Insect Repellents: Efficacy, Safety, and Toxicity', *Wilderness Environ Med*, 27: 153-63.
- Egyed, László, Péter Élő, Zsuzsanna Sréter-Lancz, Zoltán Széll, Zsuzsanna Balogh, and Tamás Sréter. 2012. 'Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of *Ixodes ricinus* ticks in Hungary', *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3: 90-94.
- Eusebi, F., E. Palma, M. Amici, and R. Miledi. 2009. 'Microtransplantation of ligand-gated receptor-channels from fresh or frozen nervous tissue into *Xenopus* oocytes: a potent tool for expanding functional information', *Prog Neurobiol*, 88: 32-40.
- Ferreira, Lorena Lopes, Jaires Gomes de Oliveira Filho, Gabriel Moura Mascarin, Adalberto A Pérez de León, and Lígia Miranda Ferreira Borges. 2017. 'In vitro repellency of DEET and β -citronellol against the ticks *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and *Amblyomma sculptum*', *Veterinary Parasitology*, 239: 42-45.
- George, J. E., J. M. Pound, and R. B. Davey. 2004. 'Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides', *Parasitology*, 129 Suppl: S353-66.
- Jongejan, F., and G. Uilenberg. 2004. 'The global importance of ticks', *Parasitology*, 129 Suppl: S3-14.
- Katz, T. M., J. H. Miller, and A. A. Hebert. 2008. 'Insect repellents: historical perspectives and new developments', *J Am Acad Dermatol*, 58: 865-71.
- Le Mauff, A., H. Chouikh, A. Cartereau, C. L. Charvet, C. Neveu, C. Rispe, O. Plantard, E. Taillebois, and S. H. Thany. 2020. 'Nicotinic acetylcholine receptors in the synganglion of the tick *Ixodes ricinus*: Functional characterization using membrane microtransplantation', *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 14: 144-51.
- Lindquist, L. 2008. 'Tick-borne encephalitis (TBE) in childhood', *Acta Paediatr*, 97: 532-4.
- Mekonnen, Sileshi, NR Bryson, LJ Fourie, RJ Peter, Arthur M Spickett, RJ Taylor, T Strydom, and Ivan Gerard Horak. 2002. 'Acaricide resistance profiles of single-and multi-host ticks from communal and commercial farming areas in the Eastern Cape and North-West Provinces of South Africa'.

Annexes

- Miller, RJ, GC Almazán, OM Estrada, RB Davey, JE George, and VZ García. 2008. 'A survey for fipronil-and-ivermectin-resistant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* collected in northern Mexico and the options for the management of acaricide-resistant ticks with pesticides', VI Seminario Internacional de Parasitología. Impacto de las enfermedades parasitarias sobre la ganadería globalizada. INIFAP-INFARVET-AMPAVE-CNGUV. Veracruz, México.
- Nauen, R., P. Jeschke, R. Velten, M. E. Beck, U. Ebbinghaus-Kintscher, W. Thielert, K. Wolfel, M. Haas, K. Kunz, and G. Raupach. 2015. 'Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide', *Pest Manag Sci*, 71: 850-62.
- Nauen, Ralf, Peter Jeschke, Robert Velten, Michael E Beck, Ulrich Ebbinghaus-Kintscher, Wolfgang Thielert, Katharina Wölfel, Matthias Haas, Klaus Kunz, and Georg Raupach. 2015. 'Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide', *Pest Management Science*, 71: 850-62.
- Nchu, F., S. R. Magano, and J. N. Eloff. 2012. 'In vitro anti-tick properties of the essential oil of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) on *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae)', *Onderstepoort J Vet Res*, 79: E1-5.
- Nchu, F., S. R. Magano, and J. N. Eloff. 2016. 'Repellent activities of dichloromethane extract of *Allium sativum* (garlic) (Liliaceae) against *Hyalomma rufipes* (Acari)', *J S Afr Vet Assoc*, 87: e1-e5.
- Prullage, JB, WG Cawthorne, LP Le Hir De Fallois, and PR Timmons. 2011. 'Synergy between fipronil and amitraz in a *Rhipicephalus sanguineus* tick residual contact test', *Experimental and Applied Acarology*, 54: 173-76.
- Rizzoli, ANNAPAOLA, HEIDI CHRISTINE Hauffe, GIOVANNA Carpi, GI Vourc'h, M Neteler, and R Rosa. 2011. 'Lyme borreliosis in Europe', *Eurosurveillance*, 16: 19906.
- Rodriguez, A., H. Zhang, J. Klaminder, T. Brodin, and M. Andersson. 2017. 'ToxId: an efficient algorithm to solve occlusions when tracking multiple animals', *Sci Rep*, 7: 14774.
- Rodriguez, Alvaro, Hanqing Zhang, Jonatan Klaminder, Tomas Brodin, Patrik L. Andersson, and Magnus Andersson. 2018. 'ToxTrac: A fast and robust software for tracking organisms', *Methods in Ecology and Evolution*, 9: 460-64.
- Stuen, Snorre, Erik Granquist, and Cornelia Silaghi. 2013. '*Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3.
- Swale, Daniel R, Baonan Sun, Fan Tong, and Jeffrey R Bloomquist. 2014. 'Neurotoxicity and mode of action of N, N-diethyl-meta-toluamide (DEET)', *PLoS One*, 9: e103713.
- Tabari, M. A., M. R. Youssefi, F. Maggi, and G. Benelli. 2017. 'Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) against the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae)', *Vet Parasitol*, 245: 86-91.
- Taillebois, Emiliane, Alison Cartereau, Jérôme Graton, Jean-Yves Le Questel, Jacques Lebreton, Monique Mathé-Allainmat, and Steeve H. Thany. 2020. 'Synergic effect of a quinuclidine benzamide complexed with borane, the LMA10233, in combination with seven pesticides', *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 168: 104633.
- Zorloni, A., B. L. Penzhorn, and J. N. Eloff. 2010. 'Extracts of *Calpurnia aurea* leaves from southern Ethiopia attract and immobilise or kill ticks', *Vet Parasitol*, 168: 160-4.

Anaïs LE MAUFF

Caractérisation moléculaire et pharmacologique des récepteurs nicotiques neuronaux chez la tique *Ixodes ricinus*.

L'augmentation des populations de tiques dans le monde, due au changement climatique et au développement de résistance aux acaricides, met en évidence le besoin de nouvelles méthodes de contrôle. La caractérisation de nouvelles cibles moléculaires aux acaricides est donc nécessaire. Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (ou nAChRs) sont des cibles pour les pesticides (comme les néonicotinoïdes) chez les arthropodes et sont peu étudiés chez la tique. Ce sont des protéines transmembranaires formées de cinq sous-unités et qui sont impliquées dans la neurotransmission synaptique rapide. Les objectifs de cette thèse sont de caractériser les profils pharmacologiques des nAChRs neuronaux chez la tique *Ixodes ricinus* et d'identifier de nouvelles molécules acaricides qui pourront être utilisées dans la prévention et la lutte contre les tiques. Pour accomplir ces objectifs de thèse, une nouvelle technique a été mise au point sur cette espèce de tique, la microtransplantation de membranes purifiées provenant du cerveau (ou synganglion) de la tique et leur expression en système hétérologue. Cette technique inédite a permis pour la première fois de caractériser les nAChRs natifs de la tique *I. ricinus*. Nous avons démontré la sensibilité des nAChRs à différents agonistes (acétylcholine et nicotine), antagonistes (alpha-bungarotoxine et méthyllycaconitine), ainsi que la faible sensibilité à des néonicotinoïdes. Néanmoins, l'utilisation d'un modulateur allostérique positif (le PNU-120596) a permis d'augmenter la sensibilité des nAChRs natifs à ces molécules. De plus, nous avons identifié plusieurs sous-unités de nAChRs chez la tique *I. ricinus*. En particulier, nous avons réalisé le clonage de sous-unité de nAChRs. En complément de ces études *in-vitro*, nous avons mené de nouvelles expériences comportementales sur des tiques adultes pour observer l'effet répulsifs de composés. Pour conclure, ces travaux ont mis en évidence la présence de nAChRs au sein du synganglion de la tique *I. ricinus*. Les résultats obtenus grâce à leur caractérisation moléculaire, électrophysiologique ainsi que l'approche comportementale sont encourageant pour le développement de nouvelles molécules acaricides et répulsives contre *I. ricinus*.

Mots clés : Récepteurs nicotiques neuronaux, Pharmacologie, Etude moléculaire, *Ixodes ricinus*, Acaricide

Molecular and pharmacological characterization of neuronal nicotinic receptors of the tick *Ixodes ricinus*.

The worldwide increase of tick population due to climate change and the development of pesticide resistance highlight the need for new control methods. The characterization of new molecular targets for acaricide is thus necessary. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are molecular target of pesticide (such as for neonicotinoids) in arthropods and are poorly studied on ticks. These are transmembrane proteins formed with five subunits and are involved in the fast synaptic neurotransmission. Objectives of this thesis is the molecular and pharmacological characterization of neuronal nicotinic receptors for the *Ixodes ricinus* tick and the identification of new acaricide molecules that could be used in tick prevention and control method. To achieve these thesis objectives, a new technique was set up on this tick species, the microtransplantation of purified membranes from the tick brain (or synganglion) and their expression in a heterologous system. This original method allows for the first time the characterization of the native nAChRs from *I. ricinus*. We determined the nAChR sensitivity to different agonists (acetylcholine and nicotine), antagonists (alpha-bungarotoxin and methyllycaconitine), as well as the poor sensitivity to neonicotinoids. Nevertheless, the use of positive allosteric modulator (PNU-120596) provided the native nAChRs sensitivity increasing to these compounds. In addition, we identified several nAChR subunits at the molecular level. In particular we achieved to clone *I. ricinus* nAChR subunits. Complementary to these *in-vitro* approaches, we carried out new behavioral assay to assess compound repellent effect on adult ticks. To conclude, this work highlighted the presence of nAChRs in the *I. ricinus* tick synganglion. Results obtained through their molecular, electrophysiological characterization, and the behavioral assay are encouraging for the development of new acaricidal and repellent molecules against *I. ricinus*.

Keywords: Neuronal nicotinic receptors, Pharmacology, Molecular study, *Ixodes ricinus*, Acaricide



Laboratoire de Biologie des Ligneux et des
Grandes Cultures, UPRES EA 1207 - USC
INRA 1328 - Université d'Orléans – Rue de
Chartres – BP 6759 45067 Orléans Cedex 2



AGENCE
INNOVATION
DÉFENSE

