Les récepteurs muscariniques peuvent-ils être considérés comme facteur clé dans le développement de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes vecteurs de maladies ?

Alexandre Pilon

▶ **To cite this version:**

Alexandre Pilon. Les récepteurs muscariniques peuvent-ils être considérés comme facteur clé dans le développement de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes vecteurs de maladies ?. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2022. Français. NNT : 2022ANGE0012 . tel-03935847

HAL Id: tel-03935847

https://theses.hal.science/tel-03935847v1

Submitted on 12 Jan 2023

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.

DOCTORAT ECOLOGIE BRETAGNE GEOSCIENCES LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

université angers

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : *« Biologie cellulaire et moléculaire »*

Par
Alexandre PILON

Les récepteurs muscariniques peuvent-ils être considérés comme facteur clé dans le développement de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes vecteurs de maladies ?

Thèse présentée et soutenue à l'Université d'Angers, le 07 Juillet 2022

Unité de recherche : Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et Récepteurs (SiFCIR), | UPRES EA 2647 | USC INRAE 1330 | SFR 4207 QUASAV

Rapporteurs avant soutenance :

	Mme Gaëlle Le Goff	Directrice de recherche, INRAE, Nice
	M. Bruno Constantin	Directeur de recherche, CNRS, Poitiers

Composition du Jury :

Examinateurs :	M. Frédéric Marion-Poll	Professeur des Universités, AgroParisTech
	M. Vincent Corbel	Directeur de recherche, IRD, Montpelier
Dir. de thèse :	Mme Valérie Raymond	Professeure des Universités, Université d'Angers
Co-encadrante :	Mme Delphine Goven	Maîtresse de conférences, Université d'Angers

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

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

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

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

« L’échec est le fondement de la réussite. »

Lao-Tseu

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté l'examen de cette thèse : le Dr Gaëlle Le Goff, le Dr Bruno Constantin, le Dr Vincent Corbel et le Pr Frédéric Marion Poll.

Je remercie également le Pr Valérie Raymond et le Dr Delphine Goven pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse au sein du laboratoire SiFCIR. Elles m'ont appris beaucoup tant d'un point de vue scientifique que d'un point de vue humain. Le docteur Alexandre Bantz a dit un jour dans sa grande sagesse « Madame Raymond vous avez toujours raison ».

Je remercie les membres du laboratoire SiFCIR avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger et de travailler au cours de mes années de master et de doctorat : le Pr Bruno Lapied, le Pr Véronique Apaire-Marchais, le Dr Caroline Deshaye, le Dr Jeremy Camon, Véronique Jean, Julie-Anne Hugel, Éléonore Moreau, Marine El Adouzi, Corinne Lefrançois, Luzia Bossé et Emanuelle Baudoin. Je voudrais remercier en particulier Josy Froger pour avoir été un de mes plus grand soutien au sein du laboratoire que ce soit au niveau technique, au niveau humain et au niveau moral. Je remercie aussi le Dr Xavier Leray pour sa bonne humeur et ses précieux conseils, je te souhaite le meilleur pour tes travaux de recherche à venir.

Que serait une vie de doctorant sans d'autres amis doctorants pour la partager ? C'est pourquoi je souhaite remercier : Alexandre, Stéphane, Céline, Éva, Laure, Javier, Sébastien, Xabi, Marie, Elenora, Constance, ainsi que les membres du groupe Doctoberfest que j'ai eu la chance de côtoyer et que je n'oublierai pas. Parmi toutes les doctorants que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse, je souhaite remercier particulièrement Timothé, Martin et Wilfried, ce fut un immense plaisir d'apprendre à brasser à vos côtés et qui sait peut-être un jour ouvrirais-je une brasserie en souvenir de tous ces moments passés avec vous.

Je remercie tous mes amis qui m'ont soutenu et accompagné durant ces quatre années de doctorat. Je sais que je n'ai pas été toujours disponible pour vous ces dernières années, mais je compte bien y remédier dès que je le pourrais. Parmi eux, je remercie en particulier : Aurélie, Eve, Élise et Elina qui ont toujours été là pour moi au quotidien et en qui je suis très reconnaissant.

Je remercie ma famille pour leurs encouragements et en particulier deux personnes. Ma tante, Françoise Pilon pour l'intérêt qu'elle porte à mes travaux. Mais surtout je remercie ma maman, à qui je dois tant et qui est mon plus grand soutient. Merci de m'avoir permis de faire ces années d'études passées et merci pour celles encore à venir. Je te serais à jamais reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour moi et j'espère te rendre fière lorsque je serais devenu médecin.

Je remercie mes camarades de promotion de médecine qui m'ont apporté leur soutient lors du cumul de ma quatrième année de doctorat et de ma deuxième année de médecine : Axel, Noélie, Sarah, Marin, Charlotte, Lison, Marine, Alban, David, Pauline et Gwenaël. J'ai également une pensée pour l'ensemble de cette promotion qui m'a accueilli et intégré, je vous souhaite à tous de devenir de bons médecins et le meilleur pour les années à venir.

Pour finir, j'ai une pensée pour celle qui partage ma vie, supporte mon stress, mes angoisses, mais aussi partage mes joies et réussites. Alizée, merci d'être à mes côtés et de m'avoir autant soutenu pendant la fin de cette thèse.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS 1

AVANT-PROPOS 4

INTRODUCTION 6

CHAPITRE 1 : MALADIES VECTORIELLES ET LUTTE ANTIVECTORIELLE 6

1. Maladies vectorielles 6
1.1. Généralités 6
1.2. Maladies vectorielles en santé des plantes 7
1.3. Maladies vectorielles en santé vétérinaire et humaine 9
1.3.1. Maladie vectorielle virale des vertébrés 9
1.3.2. Maladie vectorielle bactérienne des vertébrés 10
1.3.3. Maladie vectorielle parasitaire des vertébrés 11
2. Lutte antivectorielle 14
2.1. Lutte biologique 14
2.2. Lutte génétique 15
2.3. Lutte physique 16
2.4. Lutte chimique 17
2.4.1. Molécules utilisées en lutte chimique 17
2.4.2. Mode d'action des insecticides neurotoxiques 18

CHAPITRE 2 : RESISTANCE ET MECANISMES MODULANT LA SENSIBILITE DES CIBLES MOLECULAIRES AUX INSECTICIDES 21

1. Résistance aux insecticides 21
1.1. Généralités 21
1.2. Mutations ponctuelles des cibles moléculaires des insecticides 21
1.3. Résistance métabolique 22
1.4. Altération de la pénétration des insecticides au niveau de la cuticule 23
1.5. Séquestration des insecticides 24
1.6. Comportements d'évitement 25
2. Mécanismes modulant la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides 26
2.1. Mécanismes impactant la structure moléculaire des cibles des insecticides 27
2.1.1. Composition en sous-unités 27
2.1.2. Épissage alternatif 28
2.1.3. Edition d'ARN 28
2.2. Rôle des protéines auxiliaires sur l'efficacité des insecticides 29
2.3. Modulation de la sensibilité des cibles aux insecticides par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation 30
3. Le calcium, un acteur clé dans la mise en place de nouvelles stratégies dans la lutte antivectorielle 33
3.1. Utilisation de virus d'insectes comme agent synergisant 33
3.2. Utilisation de produits phytosanitaires comme agents synergisants 34

CHAPITRE 3 : RECEPTEURS MUSCARINIQUES : DES RECEPTEURS DE LA FAMILLE DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G 36

1. Récepteurs muscariniques de mammifères 36
1.1. Structure moléculaire 36
1.1.1. Structure des récepteurs muscariniques 36
1.1.2. Dimérisation et hétéromérisation des mAChRs 39
1.2. Transduction du signal par les mAChRs dans le système nerveux 40
1.2.1. Voies de signalisation régulées par les sous-unités Gα couplées aux mAChRs 41

1.2.2. Voies de signalisation régulées par les dimères Gβγ couplés aux mAChRs 43
1.2.3. Régulation de canaux ioniques neuronaux par les mAChRs.....43
1.2.4. Désensibilisation, internalisation et recyclage des mAChRs.....45
1.3. Rôles physiologiques des récepteurs mAChRs 49
1.3.1. Fonction des mAChRs selon leur localisation synaptique.....49
1.3.2. Rôles physiologiques des mAChRs neuronaux 51
1.3.3. Pharmacologie des mAChRs de mammifères.....53
2. mAChRs d'insectes, des récepteurs méconnus..... 56
2.1. Aspects moléculaires et pharmacologiques des mAChRs d'insectes 56
2.2. Localisation cellulaire des mAChRs chez les insectes.....59
2.3. Rôles physiologiques des mAChRs chez les insectes 59
2.3.1. Rôle des mAChRs dans le système moteur 59
2.3.2. Rôle des mAChRs dans la mémoire et l'apprentissage.....60
2.3.3. Rôle des mAChRs dans les systèmes sensoriels.....62

OBJECTIFS 64

MATERIELS, METHODES ET MODELES D'ETUDES 65

1. Moustique *Anopheles gambiae* 65
2. Identification des séquences et quantification de l'expression des mAChRs d'*An. gambiae* 67
2.1. Identification et analyse des séquences protéiques des mAChRs dans le génome du moustique *Anopheles gambiae* par analyse bio-informatique 67
2.2. Clonage des différents mAChRs d'*An. gambiae*.....67
2.2.1. Amplification par PCR des séquences codantes des mAChRs.....67
2.2.2. Purification des amplicons obtenus par PCR 69
2.2.3. Insertion des séquences codantes des mAChRs dans le vecteur de clonage pCR-Blunt 69
2.2.4. Transformation de bactéries compétentes par choc thermique et criblage des clones recombinants.....70
2.2.5. Purification des plasmides recombinés 70
2.3. Quantification de l'expression des ARNm des mAChRs dans les cellules du système nerveux d'anophèle. 71
3. Expression des mAChRs dans un système hétérologue, les cellules *Sf*9 72
3.1. Modèle cellulaire : les cellules *Sf*9.....72
3.2. Sous-clonage des séquences des mAChRs dans le vecteur d'expression pIB/V5-His.....73
3.3. Culture des cellules *Sf*9 et transfection des cellules avec des vecteurs contenant les séquences des mAChRs 74
3.4. Établissement de lignées stables contenant le plasmide pIB-mAChR-A ou pIB/V5-His 75
4. Caractérisation pharmacologique et fonctionnelle des mAChRs 76
4.1. Etude de la variation de calcium cytoplasmique en réponse à l'activation des récepteurs muscariniques par imagerie calcique 76
4.1.1. Principe de la technique d'imagerie calcique 76
4.1.2. Protocole d'enregistrement de la variation de la concentration en calcium cytoplasmique par imagerie calcique 77
4.1.3. Caractérisation pharmacologique des mAChRs 77
4.1.4. Caractérisation de la voie de signalisation couplée aux mAChRs 78
4.1.5. Analyse des données.....78
5. Étude de l'impact de l'activation du mAChR-A sur la sensibilité de l'AChE1 à un organophosphoré. 79
5.1. Co-expression du mAChR-A et de l'AChE1 en système hétérologue.....79
5.2. Dosage de l'activité de l'AChE selon la méthode d'Ellman.....79

RESULTATS..... 81

1. Identification, analyse et clonage des séquences des récepteurs muscariniques d'anophèles..... 81

1.1. Identification des mAChRs dans le protéome d'*An. gambiae* et analyse des séquences prédites 81
1.2. Analyse de la séquence clonée du récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* 82
1.3. Analyse des séquences clonées du récepteur mAChR-B d'*An. gambiae* 84
1.4. Analyse de la séquence clonée du récepteur mAChR-C d'*An. gambiae* 86
2. Analyse de l'expression des transcrits des mAChRs dans les cellules nerveuses 87
3. Étude pharmacologique et fonctionnelle des récepteurs muscariniques de type A et de type C 88
3.1. Expression fonctionnelle des récepteurs mAChR-A et mAChR-C dans des cellules *Sf*9 88
3.2. Pharmacologie du récepteur muscarinique mAChR-A 89
3.3. Identification de la voie de signalisation du récepteur mAChR-A 93
4. L'activation du récepteur mAChR-A d'anophèle peut-elle moduler la sensibilité d'une cible aux insecticides ? 95
4.1. Étude de l'effet des répulsifs DEET et IR3535 sur le récepteur mAChR-A 95
4.2. Impact de l'activation du récepteur mAChR-A sur la sensibilité de l'acétylcholinestérase à un insecticide 97

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 99

1. Discussion 99
2. Conclusions et perspectives 103

BIBLIOGRAPHIE 106

TABLE DES ILLUSTRATIONS 132

TABLE DES TABLEAUX 134

ANNEXE 135

Liste des abréviations

$[Ca^{2+}]_i$: concentration en calcium intracellulaire

α-Bgt : α-bungarotoxine

ABC : transporteur à cassette liant l'ATP (« ATP binding cassette »)

ABCG : protéines ABC de la famille G

AC : adénylate cyclase

ACh : acétylcholine

AChE : acétylcholinestérase

AChE1 : acétylcholinestérase de type 1

*Ac*MNPV : *Autographa californica* multiple nucléopolyhedrovirus

AM : acétoxyméthylester

AMPA : α-amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARNm : ARN messager

AtCh : acétylthiocholine

ATP : adénosine triphosphate

Bti : *Bacilus thuringiensis* var. *israelensis*

CaM : calmoduline

CaMK : famille de protéine kinase dépendante de la calmoduline

CaMKII : protéine kinase II dépendante de la calmoduline

Carbachol : carbamylcholine

Ca_v : canal calcique dépendant du potentiel

CSP : protéines chémosensibles (« chemosensory protein »)

DAG : diacylglycérol

DCJW : décarbométhoxylé JW062

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

DEET : N, N-diéthyl-3-méthylbenzamide

DTNB : 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoate

DUM : neurones dorsaux impairs médians (« dorsal unpaired median »)

e1, e2, e3 : boucles extracellulaires 1 , 2 et 3.

GABA : acide γ-aminobutyrique

GABAR : récepteurs ionotropes à l'acide γ-aminobutyrique

GDP : guanosine diphosphate

GIRK : courant potassique rectifiant activé par les protéines G («G protein-gated inward rectifier K^+ current »)

GPI : ancre glycophosphatidylinositol

GRK : kinase ciblant les récepteurs couplés aux protéines G (« G protein-coupled receptor kinase »)

GST : glutathion S-transférases

GTP : guanosine triphosphate

Hélice 8 : huitième hélice α des récepteurs muscariniques

i1, i2, i3 : boucles intracellulaires 1 , 2 et 3.

IP_3 : inositol triphosphate

IP_3R : récepteurs canaux à l'IP_3

IR3535 : butylacétylaminopropanoate d'éthyle

IRAC : insecticide resistance action committee

Kdr : résistance « knock-down »

KO : invalidation génique (« knock out »)

LAV : lutte antivectorielle

LP : liquide physiologique

mAChRs : récepteurs cholinergiques de types muscariniques

MAPK : MAP kinases

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

MT : neurotoxines muscariniques

nAChRs : récepteurs cholinergiques de types nicotiniques

NAM : modulateurs allostériques négatifs

Na_v : canal sodique dépendant du potentiel

NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique

OMS : Organisation mondiale de la santé

OP : organophosphorés

P450 : cytochromes P450

PA : potentiel d'action

PAM : modulateurs allostériques positifs

PID : pulvérisations intradomiciliaires

PIP_2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PI-PLC : phospholipase C spécifique des phosphatidylinositol

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PKG : protéine kinase G

PLC : phospholipase C

QNB : quinuclidinyl benzilate

qPCR : PCR quantitative

RCPG : récepteurs couplés aux protéines G

RE : réticulum endoplasmique

SAP : protéines sensorielles d'appendices (« sensory appendage protein »)

SC : axones collatéraux de Schaffer

*Sf*9-mAChR-A : lignée de cellules *Sf*9 exprimant de façon stable le mAChR-A d'*An. gambiae*

*Sf*9-pIB-vide : lignée de cellules *Sf*9 exprimant de façon stable le vecteur pIB

SiFCIR : signalisation fonctionnelle des canaux ioniques et récepteurs

SNC : système nerveux central

SNP : système nerveux périphérique

TM : segment transmembranaire

Avant-propos

Les maladies vectorielles regroupent l'ensemble des pathologies pour lesquelles l'agent pathogène est transmis par un vecteur. Étant donné leur fort impact sur les populations humaines et sur les activités humaines comme l'agriculture et l'élevage, elles présentent donc des enjeux majeurs en termes de santé humaine, vétérinaire et en santé des plantes.

Les maladies à transmission vectorielle représentent une menace importante partout dans le monde. Elles peuvent être causées par divers types de pathogènes, comme des virus, des bactéries ou des parasites, transmis d'un hôte à un autre par un vecteur. La majorité des vecteurs sont des arthropodes et particulièrement des insectes hématophages et des insectes suceurs de sève. Aujourd'hui, plus de 80% de la population mondiale vit dans des zones géographiques où le risque de contracter une des principales maladies vectorielles est présent. En santé humaine, elles sont responsables de 17% des maladies transmissibles et correspondent à plus de 700 000 décès annuels. Outre leur impact sanitaire, elles ont également un impact économique important ralentissant le développement des pays touchés. Par exemple, l'OMS rapporte que sur une période de 25 ans, de 1965 à 1990, la croissance du produit intérieur brut par habitant des pays exempts de paludisme a été 5 fois supérieure à celle des pays touchés par cette maladie (OMS 2016, 2017). En santé vétérinaire et en santé des plantes, les enjeux majeurs concernent principalement l'industrie de l'élevage et l'agriculture. Accompagnant le développement économique et la croissance rapide de la population humaine, un accroissement rapide de la taille des élevages et des surfaces agricoles cultivées a conféré aux arthropodes et aux pathogènes associés des opportunités fortes de développement. Dans ces industries, ces maladies entrainent des pertes économiques importantes (Claire *et al.* 2017; Huang *et al.* 2020).

Les insecticides sont les principaux moyens de défense utilisés dans la protection des cultures, des élevages et des populations humaines contre les insectes vecteurs. La plupart des insecticides correspondent à des neurotoxiques ciblant divers récepteurs et canaux membranaires présents à la surface des neurones, comme les récepteurs nicotiniques ou les canaux sodiques dépendants du potentiel. Depuis le DDT, le premier insecticide utilisé à grande échelle, de nombreuses classes d'insecticides ont fait progressivement leur apparition comme les organophosphorés dans les années 1950 ou les carbamates dans les années 1960 (Casida et Durkin 2013). Cependant, l'utilisation non raisonnée des insecticides au cours des dernières décennies a entrainé l'apparition de populations d'insectes résistants. Ces résistances aux insecticides prennent source dans des modifications au niveau des cibles moléculaires des insecticides (mutations, modification de l'expression), une augmentation de l'activité métabolique de détoxication, des modifications de la cuticule diminuant la pénétration des insecticides ou encore des comportements d'évitement (Chareonviriyaphap *et al.* 2013; Liu 2015; Balabanidou *et al.* 2018). De plus, le nombre de classes d'insecticides disponibles est de plus en plus restreint. Cela est dû à un durcissement des exigences environnementales et toxicologiques des organismes régulant leur utilisation. Ces organismes interdisent progressivement l'utilisation de certaines classes d'insecticides et rendent la mise sur le marché de nouvelles molécules de plus en plus compliquée et exigeante (Lamberth *et al.* 2013). Afin de répondre aux exigences environnementales, politiques, sanitaires et économiques, la mise au point de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes vecteurs de maladies est donc aujourd'hui une nécessité.

Le nombre de cibles moléculaires des insecticides est relativement restreint. Jusque dans les années 1950, elles étaient au nombre de 3. Ce nombre a augmenté progressivement jusqu'à atteindre aujourd'hui le

nombre de 22. Depuis quelques années, un certain intérêt a émergé pour les récepteurs couplés aux protéines G qui sont aujourd'hui considérés comme de potentielles cibles pour de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes (Liu *et al.* 2021; Ozoe 2021). Le rôle de ces récepteurs est critique au niveau de la physiologie cellulaire et du comportement, ce qui en fait des cibles prometteuses dans le développement de nouvelles molécules pour l'industrie. De plus, bien que ces récepteurs soient des cibles largement exploitées par l'industrie pharmaceutique, ils restent sous-exploités par l'industrie agrochimique (Pietrantonio *et al.* 2018; Swale 2019; Liu *et al.* 2021).

Parmi les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs muscariniques sont des cibles prometteuses. De précédents travaux menés au laboratoire SiFCIR ont montré que l'activation des récepteurs muscariniques pouvait entrainer une hausse de la concentration en calcium intracellulaire, conduisant à une augmentation de la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides (Abd-Ella *et al.* 2015; Moreau *et al.* 2020). Les récepteurs muscariniques sont très bien caractérisés chez les vertébrés, mais chez les insectes, ils n'ont été que très peu étudiés. Les principales caractéristiques moléculaires et pharmacologiques ont été décrites chez la drosophile *D. melanogaster* (Collin *et al.* 2013; Ren *et al.* 2015; Xia *et al.* 2016).

L'objectif des travaux de thèse rapportés ici est d'identifier et de caractériser les récepteurs muscariniques chez un insecte vecteur de maladie, le moustique *Anopheles gambiae*, et d'étudier le potentiel rôle que ces récepteurs peuvent avoir dans la modulation de la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides. Pour cela, ce manuscrit se présentera en quatre parties. La première partie sera divisée en 3 chapitres. Le premier traitera des maladies vectorielles et des méthodes de lutte employées contre les vecteurs, le second chapitre abordera les mécanismes de résistance et les mécanismes régulant la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides et le troisième chapitre présentera les récepteurs muscariniques des vertébrés et des insectes. La seconde partie présentera notre modèle biologique : le moustique *Anopheles gambiae*, notre modèle d'expression hétérologue : les cellules *Sf*9, ainsi que les différentes techniques et méthodes utilisées dans cette étude. La troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus. La quatrième et dernière partie discutera des résultats obtenus et présentera une conclusion et des perspectives de recherche pour des travaux futurs.

Introduction

Chapitre 1 : Maladies vectorielles et lutte antivectorielle

1. Maladies vectorielles

1.1. Généralités

Une maladie vectorielle est une maladie dont l'agent pathogène est transmis d'un hôte à un autre par un arthropode vecteur. La maladie résulte donc de l'infection de l'hôte par un agent pathogène pouvant être un virus, une bactérie, un protozoaire ou encore un nématode (Chuche *et al.* 2017; Mullen 2019).

Les composants d'un cycle de transmission d'une maladie vectorielle sont : i) un agent pathogène qui peut se développer et/ou se multiplier sur les tissus de l'hôte et du vecteur, ii) un hôte qui développera un niveau d'infection permettant la transmission au vecteur et iii) un vecteur acquérant le parasite depuis un hôte et pouvant en assurer la transmission. On peut parler de pathosystème (Eigenbrode *et al.* 2018).

Les agents pathogènes de ces maladies ont évolué afin de pouvoir tolérer les conditions de vie au sein de l'hôte et du vecteur. Ils doivent par exemple pouvoir tolérer les hautes températures corporelles d'un hôte vertébré tout comme celles plus basses de certains vecteurs comme les insectes. La transmission du pathogène peut être horizontale ou verticale (Figure 1). La transmission horizontale correspond à la transmission du pathogène entre vecteurs. Elle peut se faire directement d'un vecteur à un autre ou au travers d'un hôte. La transmission verticale correspond à la transmission directe du pathogène d'une génération à l'autre ou au cours des différents stades de développement du vecteur (Mullen 2019; Jeger 2020).

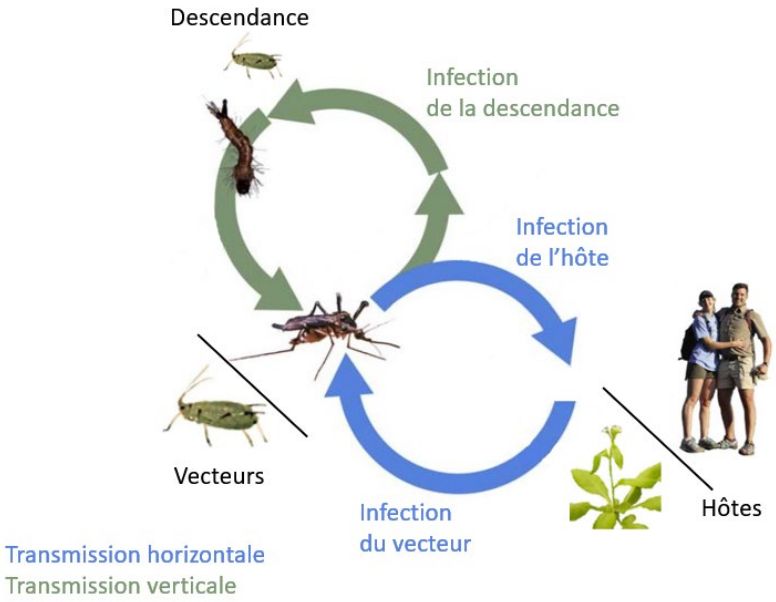

Figure 1 : Schéma récapitulatif des modes de transmission des maladies vectorielles. Modifié d'après Mullen 2019.

Les pathogènes se répliquant ou se reproduisant de façon asexuée ne subissent pas de métamorphose et conservent la même forme selon qu'ils infectent le vecteur ou l'hôte. Les pathogènes plus évolués qui ont une reproduction sexuée présentent des stades de développement différents au sein de l'hôte et du vecteur. Pour un même pathogène, l'organisme au sein duquel a lieu l'union des deux gamétocytes est appelé hôte définitif alors que celui où la multiplication est asexuée est appelé hôte intermédiaire. L'hôte ou le vecteur peut, selon le cycle de développement du parasite, être l'hôte définitif ou l'hôte intermédiaire (Mullen 2019).

La transmission de pathogène depuis l'hôte vers le vecteur dépend de plusieurs paramètres. Le premier est l'accessibilité, un hôte doit être suffisamment abondant et accessible pour que le vecteur puisse se nourrir de façon régulière. Ce paramètre peut être régulé de façon très précise selon l'activité du vecteur ou de l'hôte. Par exemple, les larves du microfilaire *Wuchereria bancrofti* migrent dans la circulation sanguine de l'hôte à des heures de la nuit où se nourrissent les moustiques les vectorisant (Mullen 2019). Le second est la susceptibilité, un hôte doit être en mesure d'être infecté par l'agent pathogène et permissif à son développement et sa reproduction, tout en restant en vie suffisamment longtemps pour permettre la transmission à un vecteur. Ainsi, une balance entre la quantité de pathogène et la virulence de la maladie doit exister afin que le pathogène puisse être transmis (Mullen 2019; Jeger 2020).

L'acquisition du pathogène par le vecteur se fait généralement par l'alimentation de ce dernier. Certains insectes piqueurs/suceurs se nourrissent de sang, de sève ou bien d'autres types de tissus provenant d'un hôte. Si l'hôte est porteur de l'agent pathogène, l'insecte sera alors infecté lors de l'ingestion des pathogènes présents dans ces fluides ou tissus. Ainsi, après une période de latence, le vecteur infecté pourra transmettre le pathogène lors de prochains repas. Cette période de latence dépend de nombreux paramètres comme la colonisation des tissus du vecteur par le pathogène. Une fois le vecteur infecté, la transmission du pathogène dépend de deux caractéristiques du vecteur : la capacité vectorielle et son abondance. La capacité vectorielle est le niveau d'efficacité d'un vecteur dans la transmission d'un agent pathogène. Elle comprend la compétence vectorielle (aptitude d'un arthropode à ingérer un agent pathogène et à le transmettre à un hôte) ainsi que les facteurs environnementaux. Afin que la transmission du pathogène soit efficace, un vecteur doit être suffisamment abondant dans l'environnement et il doit présenter une certaine fidélité pour l'hôte ainsi qu'une bonne compétence vectorielle.

1.2. Maladies vectorielles en santé des plantes

Les vecteurs de pathogènes chez les plantes sont généralement des insectes piqueurs/suceurs se nourrissant de la sève des végétaux. Ces insectes possèdent des pièces buccales spécialisées, appelées stylet, qui leur permettent d'atteindre le xylème et le phloème et aspirer la sève (Whitfield *et al.* 2015; Eigenbrode *et al.* 2018). Une grande part des insectes vecteurs de phytopathogène appartient à l'ordre des hémiptères. La plupart des vecteurs de bactéries appartient au sous-ordre des Auchenorrhyncha qui comporte d'une part les fulgores, ainsi que les cicadelles, les cercopes et les cigales. Une seule sous-famille du sous-ordre des Sternorrhyncha, les psylles, peut être vectrice de bactéries (Perilla-Henao et Casteel 2016). Les vecteurs de virus appartiennent à d'autres familles des hémiptères. Dans le sous-ordre des Sternorrhyncha, on trouve les aleurodes, les cochenilles et les pucerons, qui jouent un rôle dans la vectorisation des virus pathogènes des plantes (Perilla-Henao et Casteel 2016). Certaines familles transmettent autant les virus que les bactéries comme les cicadelles, les fulgores ou bien les punaises (Perilla-Henao et Casteel 2016).

Les phytopathogènes transmis par les insectes peuvent être classés selon leur mode de transmission en deux catégories. La 1re comprend les pathogènes ayant une transmission non circulatoire et la 2de est composée des pathogènes présentant une transmission circulatoire (Whitfield *et al.* 2015; Perilla-Henao et Casteel 2016; Eigenbrode *et al.* 2018; Jeger 2020). Concernant la transmission non circulatoire, la principale caractéristique est l'absence de la pénétration du pathogène dans l'hémolymphe de l'insecte. Ainsi, lors de l'acquisition du pathogène par le vecteur, il se fixe sur certaines parties du corps du vecteur comme les pièces buccales ou le tube digestif. Plus précisément, cette transmission non circulatoire est sous-catégorisée en transmission non persistante et semi-persistante selon le temps que reste fixé le pathogène. Pour ce qui concerne les pathogènes à transmission non persistante, leur transmission n'est possible que durant quelques minutes. En effet, ces pathogènes sont généralement retenus dans le stylet ou à l'entrée du tube digestif du vecteur, mais ne peuvent s'y attacher durablement (Whitfield *et al.* 2015; Perilla-Henao et Casteel 2016; Eigenbrode *et al.* 2018). Les pathogènes à transmission semi-persistante peuvent quant à eux être retenus de façon plus durable dans le canal alimentaire ou bien dans la lumière du tube digestif antérieur de l'insecte. On parle de transmission semi-persistante quand l'acquisition du pathogène se fait à un stade préimaginal (larve ou nymphe) et que la capacité à transmettre le pathogène est perdue lors de la mue vers le stade de développement suivant (Perilla-Henao et Casteel 2016). Enfin, la transmission est circulatoire, ou persistante, lorsque le pathogène se propage dans le corps de l'insecte *via* l'hémolymphe. La propagation du pathogène se fera jusqu'aux glandes salivaires du vecteur. Le pathogène pourra être transmis à un nouvel hôte par la salive lors de repas suivants. La transmission peut aussi être sous-catégorisée comme non-propagatrice ou propagatrice, cela dépend de la faculté du pathogène à se multiplier au sein du vecteur (Perilla-Henao et Casteel 2016; Eigenbrode *et al.* 2018; Jeger 2020).

Chez les plantes, les agents pathogènes des pathosystèmes connus sont en grande majorité des virus et dans une moindre mesure des bactéries. Il peut dans certains cas s'agir de micromycètes ou de nématodes (Eigenbrode *et al.* 2018; Li *et al.* 2020). Par la suite, seuls les virus seront abordés.

Les virus phytopathogènes transmis par les insectes ont été plus largement étudiés que les bactéries. Une très grande majorité des virus pathogènes des plantes sont transmis par des vecteurs spécifiques (Whitfield *et al.* 2015; Gallet *et al.* 2018). Au sein d'un même genre de virus, toutes les espèces sont transmises par le même type de vecteur. Par exemple, au sein de la famille des *Potyviridae*, les espèces appartenant au genre *Potyvirus* sont vectorisées par les pucerons, alors que les espèces appartenant au genre *Ipomovirus* sont transmises par les aleurodes (Whitfield *et al.* 2015).

On peut classer les virus responsables de phytopathologies vectorielles selon leur mode de transmission. Cinq familles présentent une transmission non circulatoire : les *Potyviridae*, les *Bromoviridae*, les *Caulimoviridae* et les *Closteroviridae*. Les virus à transmission non circulatoire sont majoritairement véhiculés par les pucerons, les cicadelles et les aleurodes. Les *Luteoviridae* et les *Geminiviridae* présentent une transmission circulatoire non-propagatrice alors que les *Bunyaviridae*, les *Reoviridae* et les *Rhabdoviridae* ont une transmission circulatoire propagatrice. Les virus à transmission circulatoire, qu'elle soit propagatrice ou non, sont transmis par les pucerons, les cicadelles et les aleurodes, mais aussi par les thrips (Whitfield *et al.* 2015; Eigenbrode *et al.* 2018; Islam *et al.* 2020).

Une liste des 10 phytovirus les plus importants d'un point de vue scientifique et économique a été établie (Scholthof *et al.* 2011). Huit d'entre eux sont transmis par des insectes. Cinq sont transmis par les pucerons comme le *Plum pox virus* causant la maladie de la Sharka qui touche les arbres fruitiers du genre *Prunus*. Deux

autres sont transmis pas les aleurodes : le *Tomato yellow leaf curl virus* et l'*African cassava mosaic virus,* et un seul par les thrips : le *Tomato spotted wilt virus*.

1.3. Maladies vectorielles en santé vétérinaire et humaine

Parmi les divers agents pathogènes impliqués dans les maladies vectorielles en santé humaine et vétérinaire, les virus et les bactéries sont les groupes regroupant la plus grande diversité, suivis par les protozoaires et les nématodes. Leurs vecteurs sont pour la plupart des arthropodes hématophages. Il peut s'agir par exemple de chélicérates comme les tiques, ou bien encore d'insectes comme les puces ou les moustiques (Mullen 2019). Nous nous concentrerons uniquement sur les maladies transmises par les insectes.

Les insectes pouvant être des vecteurs de maladie touchant les vertébrés appartiennent principalement à 4 ordres. Un des principaux ordres d'insectes vecteurs est l'ordre des diptères. C'est au sein de cet ordre que l'on retrouve les moustiques, mais aussi les culicoïdes ou bien encore les glossines dont le représentant le plus connu est la mouche tsé-tsé (Wamwiri et Changasi 2016; Hashiguchi et Gomez 2018; Mullen 2019). Toutes les espèces des ordres des siphonaptères et des phtiraptères sont des vecteurs de pathogène. Il s'agit respectivement des puces et des poux (Mullen 2019; Hamzaoui *et al.* 2020). Comme chez les plantes, certains insectes de l'ordre des hémiptères peuvent être des vecteurs de maladie et notamment les réduves (Echeverria et Morillo 2019; Mullen 2019).

La classification des modes de transmission diffère entre les maladies vectorielles des plantes et celle des vertébrés. On peut catégoriser la transmission horizontale en 4 classes différentes : mécanique, multiplicative, cyclodéveloppementale et cyclopropagative. Ces trois dernières sont des transmissions biologiques. Dans le cas de la transmission mécanique, le pathogène est transmis par des appendices de l'insecte porteur du pathogène. Le plus souvent, il s'agit des pièces buccales (Mullen 2019). Lors d'une transmission biologique, le pathogène se reproduit au sein de l'organisme. La transmission multiplicative concerne les pathogènes ne réalisant pas de reproduction sexuée au sein de l'hôte ou du vecteur. Dans ce cas, le pathogène n'effectue pas de métamorphose. On parle de transmission cyclodéveloppementale lorsque le pathogène se développe, mais ne se multiplie pas au sein du vecteur. Enfin, on parle de transmission cyclopropagative lorsque le pathogène se développe et se reproduit de façon asexuée au sein du vecteur (Mullen 2019).

1.3.1. Maladie vectorielle virale des vertébrés

Les virus impliqués dans les maladies vectorielles des vertébrés sont appelés arbovirus. La plupart des arbovirus sont zoonotiques, c'est-à-dire qu'ils peuvent être transmis des animaux à l'homme. Dans ce cas, la transmission vers l'humain se fait selon trois modalités : i) une transmission directe du vecteur depuis l'hôte animal sauvage vers l'homme, ii) une amplification chez les animaux domestiques suivie d'une transmission à l'homme par le vecteur et iii) la mise en place d'un pathosystème humain (hôte) - virus - vecteur (Weaver *et al.* 2018). La plupart des infections par une arbovirose chez l'homme présentent des caractéristiques communes : une incubation courte (de 3 à 10 jours) et des symptômes similaires. Ces symptômes peuvent être : i) un état grippal, parfois associé à des éruptions cutanées, des douleurs articulaires ou encore un ictère, ii) une encéphalite ou une ménencéphalite et iii) dans certains cas, une fièvre hémorragique. Certaines maladies vectorielles comme la dengue, le chikungunya ou la maladie à virus Zika font l'objet d'un intérêt particulier de par leur émergence ou leur réémergence (Weaver *et al.* 2018).

Une grande majorité des arbovirus appartient aux familles des *Flavivridae*, *Reoviridae, Rhabdoviridae, Togaviridae*, ainsi qu'à l'ordre des *Bunyavirales.* Ces virus se multiplient au sein de leur vecteur, leur transmission est donc multiplicative (Franz *et al.* 2015; Halbach *et al.* 2017). La plupart des virus ayant une importance en santé humaine appartient aux *Flaviviridae, Togaviridae* et *Bunyaviridae* et sont transmis par les moustiques et plus spécifiquement par ceux des genres *Aedes* et *Culex*. Une exception subsiste pour le virus O'nyong-nyong qui est transmis par les moustiques du genre *Anopheles* (Franz *et al.* 2015). Les autres vecteurs majeurs des arbovirus sont les *Culicoïdes,* de petits moucherons piqueurs pouvant transmettre des virus ayant un impact important en santé vétérinaire. Parmi les virus les plus transmis par ces insectes, on trouve, par exemple, le virus de la peste équine africaine, le virus de la fièvre catarrhale ou encore le virus de la maladie hémorragique épizootique (Sick *et al.* 2019).

Ces maladies ont un impact fort notamment d'un point de vue économique. Par exemple, chez l'homme, l'arbovirose ayant le plus d'impact est la dengue. Plus de 2,5 milliards de personnes vivent dans des pays où cette pathologie est endémique ce qui représente une part importante de la population. Au niveau mondial, le nombre de cas rapportés par l'OMS pour cette maladie augmente progressivement depuis les années 2000, passant de 505 430 cas en 2000 à 5,2 millions de cas en 2019 (OMS 2021a). Cependant, tous les cas ne sont pas rapportés. Par exemple, il a été estimé qu'en 2013 le nombre de cas de dengue dans le monde serait en réalité de 58,40 millions, dont 13 586 décès, générant un coût de 8,9 milliards de dollars (hors mesure de lutte antivectorielle) (Shepard *et al.* 2016). Chez les animaux, la fièvre catarrhale est une maladie touchant les ruminants. Cette maladie est présente sur tous les continents, excepté l'antarctique et est considérée comme ayant des conséquences économiques sévères par l'organisation mondiale pour la santé animale. Par exemple, en 2007, l'impact financier de la fièvre catarrhale est estimé en France et aux Pays-Bas à une perte de 1,4 milliard et 85 millions de dollars respectivement (Rushton *et al.* 2015).

1.3.2. Maladie vectorielle bactérienne des vertébrés

La plus grande majorité des maladies vectorielles bactériennes ayant une importance en santé animale et vétérinaire ne sont pas transmises par des insectes, mais par des arachnides : les tiques et les acariens. Les insectes responsables de la transmission de pathogènes bactériens chez les vertébrés sont principalement les poux et les puces (Mullen 2019).

Parmi les insectes vecteurs de maladie, les puces sont les vecteurs les plus importants de bactérie. Elles sont responsables de la transmission de *Yersinia pestis*, l'agent pathogène responsable de la peste. Cette maladie reste une menace dans de nombreuses régions du fait du réservoir que constituent les rongeurs. La transmission de la peste est multiplicative. En effet, la bactérie, à la suite de son ingestion par la puce lors d'un repas de sang, envahit l'intestin moyen entrainant un blocage du tube digestif. Une fois ce blocage établi, les puces ne sont plus capables d'ingurgiter de repas de sang et le régurgitent dans l'hôte, ce qui conduit à la transmission de la bactérie (OMS 2009; Yang 2017; Mullen 2019). Bien que la peste soit parfois considérée comme une maladie « du moyen âge », des foyers épidémiques ressurgissent régulièrement. Entre 2004 et 2008, 11 479 cas de peste humaine, dont 772 décès, ont été rapportés dans le monde (OMS 2009). Les puces sont aussi vectrices de *Rickettsia typhi*, l'agent pathogène du typhus murin. La transmission de cette maladie se fait par les puces à la fois lors du repas de sang, mais aussi par la pénétration de leurs déjections au travers des lésions cutanées provoquées par le grattage (Buchanan 2018; Laroche *et al.* 2018; Mullen 2019). D'autres bactéries du genre *Rickettsia* peuvent être

transmises par les puces et les poux. Par exemple, *Rickettsia felis*, l'agent pathogène de la fièvre pourprée des chats et *R. prowazekii*, responsable du typhus exanthématique, peuvent être transmis par les puces et les poux de corps respectivement (Brown et Macaluso 2016; Buchanan 2018). De plus, les poux de corps peuvent être vecteurs de la bactérie *Borrelia recurrentis* qui est l'agent pathogène de la fièvre récurrente des poux. Comme pour les bactéries du genre *Rickettsia*, la transmission de cette bactérie se fait lors d'une piqûre par l'insecte ou lors de la pénétration des déjections par voie cutanée (Warrell 2019).

1.3.3. Maladie vectorielle parasitaire des vertébrés

Les agents pathogènes des maladies parasitaires vectorielles peuvent être des helminthes, comme les filarioses ou les onchocercoses (Duvallet et Boireau 2015).

Parmi les espèces de nématodes filaires ayant pour hôte les humains, quatre sont responsables d'infections. *Wucheria bancrofti, Brugia timori* et *Brugia malayi* sont les agents pathogènes responsables des filarioses lymphatiques. Ces parasites, sous leur forme adulte, se logent dans les vaisseaux lymphatiques et entrainent leur obstruction et leur dilatation (lymphangiectasie). Ces microfilaires migrent dans les vaisseaux sanguins périphériques selon un cycle de 24h, atteignant une concentration maximale au moment de la journée où leur vecteur réalise leur repas de sang facilitant ainsi l'infection d'un nouveau vecteur (Taylor *et al.* 2010; Mullen 2019). Les vecteurs de ces pathogènes sont des moustiques, mais les espèces vectrices peuvent varier. Par exemple, le moustique *Culex quinquefasciatus* est un vecteur important dans les zones urbaines d'Amérique, mais aussi dans certaines parties d'Asie et d'Afrique, alors que dans les zones rurales, il s'agit d'espèces appartenant au genre *Anopheles*. La filariose lymphatique est très incapacitante si elle n'est pas traitée. La phase aigüe entraine de la fièvre, des douleurs dans les membres infectés et une inflammation au niveau des ganglions et des vaisseaux lymphatiques. La phase chronique consiste en la formation de lymphœdèmes entrainant la distension de la peau ainsi que la formation de nodule à sa surface. On appelle cet état éléphantiasis (Mullen 2019). L'onchocercose est quant à elle une maladie dont les agents pathogènes sont des nématodes appartenant au genre *Onchocerca*. Chez l'homme, l'espèce *Onchocerca volvulus* est responsable de cette maladie. Ces parasites migrent dans la peau et les yeux, et leur mort entraine une inflammation résultant en démangeaisons et dermatites. Les patients ayant des formes chroniques peuvent présenter une dépigmentation ainsi que des signes de vieillissement prématuré de la peau. Ces parasites provoquent de sévères altérations visuelles voire une cécité. Les mouches noires appelées simulies sont les principaux vecteurs de ces nématodes chez l'homme (Taylor *et al.* 2010; Mullen 2019; Lakwo *et al.* 2020). L'onchocercose existe également chez les animaux, et particulièrement chez les bovidés, les équidés et les camélidés. Elles sont causées par d'autres parasites du genre *Onchocerca*, comme *O. fasciata* ou *O. gutturosa.* Les parasites responsables de ces maladies chez les animaux ont aussi pour vecteur les simulies, mais aussi les culicoïdes (Duvallet et Boireau 2015).

Ces maladies touchent un grand nombre de personnes dans le monde. Selon l'OMS, en 2019, 858,3 millions de personnes ont été concernées par l'administration médicamenteuse de masse afin de mettre fin à la transmission des filarioses lymphatiques et 216,4 millions de personnes pour l'onchocercose (OMS 2019, 2020a).

Les filarioses animales regroupent d'autres pathologies pouvant avoir un impact économique important. Par exemple, la filariose artérielle des camélidés, causée par *Dipetalonema evansi* et transmise par des moustiques du genre *Aedes*, se manifeste par une hyperthermie, un amaigrissement et une hypertrophie du scrotum conduisant à une baisse de la fertilité voire à la mort de l'individu. Les parafilarioses équines et bovines

sont provoquées par des parasites du genre *Parafilaria* et sont transmises par des mouches de la famille des Muscidae. Elles se manifestent par l'apparition de nodules cutanés hémorragiques (Duvallet et Boireau 2015).

Les maladies parasitaires chez les vertébrés peuvent aussi être causées par des protozoaires. La leishmaniose est une maladie dont les agents pathogènes appartiennent au genre *Leishmania* et sont transmis par les phlébotomes. Il existe plusieurs formes de la maladie : la leishmaniose viscérale, qui après traitement peut évoluer vers une forme dermique appelée leishmaniose post-kala-azar, et la leishmaniose cutanée qui peut évoluer vers une forme plus sévère appelée leishmaniose cutanéo-muqueuse. La forme viscérale, également appelée kala-azar, est caractérisée par une fièvre irrégulière ainsi qu'une splénomégalie, mais d'autres symptômes peuvent aussi être communément associés comme une pancytopénie ou une hépatomégalie. La forme cutanée entraine l'apparition de lésions cutanées et de nodules et la forme cutanéo-muqueuse se caractérise par des lésions destructives du septum nasal, des lèvres et du palais. Contrairement à la leishmaniose viscérale qui est mortelle dans plus de 95% des cas si elle n'est pas traitée, la forme cutanée n'engage pas de pronostic vital, mais entraine une stigmatisation sociale. En 2017, il a été estimé entre 50 000 et 90 000 cas de forme viscérale et entre 700 000 et 1 million de cas de forme cutanée dans le monde selon l'OMS (Burza *et al.* 2018).

Deux parasites du genre *Trypanosoma*, *Trypanosoma cruzi* et *Tripanosoma brucei* sont responsables respectivement de la maladie de Chaggas (trypanosomiase américaine) et de la maladie du sommeil (trypanosomiase africaine). Leurs vecteurs sont cependant différents. *Trypanosoma cruzi* a pour vecteur les insectes de la famille des Reduviidae appartenant au sous-ordre des hétéroptères (punaises) portant le nom de triatome, alors que *Tripanosoma brucei* est transmis par les diptères du genre *Glossina*, appelés glossine ou encore mouche tsé-tsé (Büscher *et al.* 2017; Echeverria et Morillo 2019). La maladie de Chaggas se caractérise par une première phase aigüe causant des douleurs, un œdème des paupières, ainsi qu'un chagome (furoncle au point de piqure). Les symptômes systémiques restent rares à ce stade. La phase chronique survient chez 30% des patients entrainant des atteintes cardiaques (perturbation du rythme cardiaque, arrêt cardiaque). Dans de rares cas, des atteintes nerveuses (dysfonction cognitive, démence) peuvent survenir (Echeverria et Morillo 2019). La trypanosomiase africaine présente un premier stade hémolymphatique suivi d'un stade meningocéphalitique lorsque les parasites franchissent la barrière hématoencéphalique. Le premier stade se manifeste par un prurit, des maux de tête et une lymphadénopathie (augmentation du volume de ganglions lymphatiques). Le second stade se traduit par des troubles neuropsychiatriques associés aux symptômes du premier stade, avec cependant, une diminution de la fièvre. Une des caractéristiques de cette maladie, lui ayant donné son nom, est une altération du sommeil consistant en des insomnies nocturnes, une somnolence diurne et une envie irrésistible de sommeil (Büscher *et al.* 2017). En 2021, l'OMS a estimé que la maladie de Chaggas touchait 6 à 7 millions de personnes dans le monde (OMS 2021b). En 2018, seulement 977 cas de maladie du sommeil ont été rapportés par l'OMS grâce aux efforts réalisés pour lutter contre cette maladie.

La maladie parasitaire ayant le plus grand impact dans le monde est le paludisme. 229 millions de cas dont 409 000 décès ont été rapportés par l'OMS en 2019. Cette maladie vectorielle est transmise par les moustiques du genre *Anopheles* auquel appartient le moustique *Anopheles gambiae* (OMS 2020b). Le paludisme est causé par 5 parasites du genre *Plasmodium* : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* et *P. knowlesii*. À l'exception de *P. knowlesii,* ces parasites présentent un réservoir uniquement humain. L'hôte naturel de *P. knowlesii* est le macaque à longue queue *Macaca fascicularis* (Jeyaprakasam *et al.* 2020). Les symptômes apparaissent 8 à 30 jours après l'infection. Le symptôme principal est une fièvre qui peut s'accompagner de

céphalées, de myalgie, d'un affaiblissement, de vomissement, de diarrhées, d'un ictère ou d'une splénomégalie inconstante. La fièvre évolue sous la forme d'un « accès palustre ». Il s'agit d'une alternance cyclique entre une phase de frisson, sensation de froid et sueur avec une phase asymptomatique. Les parasites infectant les globules rouges, les cycles d'accès palustres coïncident avec la multiplication des parasites et l'éclatement des hématies qui vont libérer des substances pyrogènes lors de la lyse cellulaire (Institut Pasteur 2013; Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales (France) *et al.* 2019). En cas de complication de la maladie, on parle de paludisme grave. Les cas graves sont quasiment tous causés par *P. falciparum* et peuvent entrainer la mort du patient. Les enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées, les patients immunodéprimés ou splénectomisés et les patients présentant des comorbidités (ex : insuffisance cardiaque, insuffisance rénale, insuffisance respiratoire, diabète…) sont plus à même de déclencher une forme grave. Dans la plupart des pays endémiques, le manque de moyens et les difficultés d'accès aux traitements restent une problématique. Par exemple, selon l'OMS, en Afrique subsaharienne, les populations les plus à risque sont les femmes enceintes et les enfants de moins de 5 ans. En 2019, dans 33 pays africains, seulement 34% des femmes ont reçu un traitement préventif intermittent complet pendant leur grossesse. De plus, selon une enquête menée dans 21 pays africains sur la période 2015-2019, 31% des enfants de moins de 5 ans n'ont pas bénéficié de soins lors d'un épisode fiévreux (OMS 2020b). Face à cette difficulté d'accès aux soins, la lutte antivectorielle est un moyen efficace utilisé pour protéger les populations.

2. Lutte antivectorielle

La lutte antivectorielle (LAV) regroupe la lutte et la protection contre les maladies vectorielles ainsi que leur surveillance. Elle permet de prévenir et de lutter contre les épidémies, d'éliminer les nouveaux foyers apparaissant dans des zones non endémiques, de réduire la transmission dans les zones à risques, de lutter contre ces pathologies dans les zones endémiques, etc… Le principal objectif des méthodes utilisées en lutte antivectorielle est de réduire ou d'éliminer les contacts entre les vecteurs et leurs hôtes afin d'éviter la transmission des pathogènes. Quatre méthodes sont employées afin de lutter contre les vecteurs de maladie : la lutte biologique, la lutte génétique, la lutte physique et la lutte chimique (Carnevale et Robert 2009; Wilson *et al.* 2020). Dans cette partie, il sera détaillé chacune de ces méthodes de lutte afin de donner un aperçu des différents moyens employés en lutte antivectorielle au sens large. Cependant, toutes les méthodes ne sont pas employées contre chaque vecteur. Par exemple, la stratégie actuelle de la lutte antipaludéenne mondiale coordonnée par l'OMS repose essentiellement sur l'emploi de moustiquaires imprégnées d'insecticides de type pyréthrinoïdes combiné à une stratégie médicale de dépistage rapide de la maladie et de traitements combinés à base d'artémisinine (OMS 2020b). Notre modèle d'étude étant le moustique *Anopheles gambiae*, dans ce manuscrit, nous décrirons donc principalement les méthodes de lutte employées contre les moustiques.

2.1. Lutte biologique

La lutte biologique est utilisée comme méthode alternative afin de réduire l'utilisation de produits chimiques. Cette méthode vise à réduire les populations de vecteurs (larves ou imagos) en utilisant des prédateurs ou des microorganismes pathogènes pour une espèce d'insecte donnée. Cette méthode présente trois avantages majeurs : i) la probabilité que les vecteurs deviennent résistants aux techniques employées est faible, ii) elle a un impact moindre sur l'environnement et iii) elle est peu couteuse.

L'utilisation de prédateurs naturels des vecteurs est une des méthodes répandues en LAV biologique. Elle consiste en l'introduction dans l'environnement d'espèces prédatrices ayant une appétence pour l'espèce vectrice ciblée. Ces prédateurs peuvent cibler les différents stades de développement des insectes. Par exemple, des espèces larvivores peuvent être introduites afin de réduire les populations de larves de moustiques. Les espèces de poisson *Gambusia affinis* et *Poecilia reticulata* ont été utilisées de façon efficace dans la lutte contre les anophèles. Outre leur action prédatrice sur les larves, la présence de ces poissons dans les sites de pontes a une action dissuasive et entraine une diminution du nombre d'œufs déposés par les femelles (Ghosh et Dash 2007; Chobu *et al.* 2015). Des espèces adultivores peuvent aussi être employées. Par exemple, la libération de prédateurs, comme les coccinelles ou bien les guêpes parasitoïdes, s'est montrée efficace dans la réduction de populations de pucerons (Yang *et al.* 2009; Riddick 2017).

Certains microorganismes pathogènes sélectifs des insectes comme les bactéries *Bacilus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) et *Bacillus sphaericus* sont utilisés comme larvicides. Ils sont sans danger pour la santé humaine et présentent un impact moindre sur l'environnement par rapport aux substances chimiques. Ces deux bactéries produisent des toxines lors de leur sporulation. Chez *B. thuringiensis*, une inclusion de protéines appelées delta-endotoxines se forme dans la cellule. L'ensemble de ces protéines sont toxiques pour les larves d'insectes suite à leur ingestion. Les bactéries *B. sphaericus* forment elles aussi un cristal d'inclusion de protéines toxiques lors de la sporulation, mais présentent aussi des toxines dans la paroi de la spore (Mittal 2003).

Bien que ces toxines bactériennes semblent être la solution idéale, leur efficacité a montré une forte variabilité sur le terrain. Cette efficacité variable est liée à la diversité des espèces ciblées, les divers habitats larvaires et les méthodes d'usage de ces produits, ainsi que l'apparition de résistances. Leur utilisation doit être guidée par une bonne connaissance des espèces locales, de leurs gites larvaires et de l'état des résistances des populations d'insectes locales (Derua *et al.* 2019; Jurat-Fuentes *et al.* 2021).

2.2. Lutte génétique

Cette forme de lutte est la plus récente en LAV. Elle consiste en l'utilisation des connaissances du patrimoine génétique des vecteurs. Pour cela, une séquence génétique sera modifiée afin de réduire les populations de vecteurs en induisant une stérilité ou bien de diminuer leur susceptibilité à transmettre les pathogènes qu'ils peuvent transporter.

La technique de l'insecte stérile, déjà utilisée dans la protection des cultures, consiste en la stérilisation d'insectes élevés en laboratoire et à les faire entrer en compétition avec les populations locales (Alphey *et al.* 2010; Gentile *et al.* 2015). Cette technique peut se faire de différentes façons. La première technique consiste en une irradiation des mâles relâchés. Cette irradiation entrainera des mutations aléatoires dominantes létales pour les spermatozoïdes produits par ces insectes, ce qui entrainera une stérilité (Bouyer et Vreysen 2020; Dyck *et al.* 2021). Une autre technique consiste à infecter une population d'insecte mâle avec une bactérie du genre *Wolbachia* puis à les relâcher. Les bactéries de ce genre peuvent entrainer la stérilité des mâles par incompatibilité cytoplasmique. Cela se traduit par une dysfonction lors de la fertilisation, avec le sperme d'un mâle infecté, d'un œuf provenant d'une femelle non infectée ou infectée avec une souche différente de la bactérie. Le développement de l'œuf sera alors stoppé (Landmann 2019). Les techniques de génétique récentes ont permis la création de moustiques *Anopheles gambiae* mâles transmettant des gènes létaux dominants aux générations suivantes. Cette méthode est nommée « technique du gène létal ». Par exemple, les mâles peuvent exprimer le gène d'une endonucléase durant la spermatogénèse. Le spermatozoïde exprimera cette protéine qui ciblera les séquences répétées du chromosome X. Le chromosome X sera alors dégradé ce qui arrêtera l'embryogenèse (Windbichler *et al.* 2008).

Une étude récente propose une nouvelle méthode innovante dans la lutte génétique. Elle consiste en la combinaison de deux mécanismes : le « sex-chromosome drive » couplé à un « sex distorder » (Simoni *et al.* 2020). Le « sex-chromosome drive » est un élément génétique situé sur un chromosome favorisant sa transmission au cours de la méiose chez des individus hétérozygotes. Ainsi, la transmission de cet élément ne suit pas les lois de Mendel au cours de la gamétogénèse et se retrouve dans la plupart, voire dans tous les gamètes produits par l'individu porteur. Souvent ces éléments génétiques ne se retrouvent que chez un des deux sexes et altèrent sa fertilité ce qui entraine des biais dans le ratio mâle/femelle dans la progéniture (Helleu *et al.* 2015). Un « sex distorder » est une distorsion dans le ratio mâle/femelle. Elle peut être induite par exemple au moyen de l'endonucléase I-PpoI dégradant spécifiquement le chromosome X. Lorsque cette enzyme est exprimée lors de la spermatogénèse, il n'y aura alors que des gamètes porteurs du chromosome Y qui seront produits et une déstabilisation du ratio mâle/femelle se produira à la génération suivante (Simoni *et al.* 2020). En combinant les deux techniques, on obtient un « sex distorder gene drive ». Les moustiques mâles ne produiront donc que des gamètes viables contenant un chromosome Y et un autosome recombinant. Cela se répétant au cours des

générations, seuls des mâles subsistent, entrainant alors un effondrement de la population de vecteurs (Simoni *et al.* 2020).

D'autres stratégies reposent sur la libération de vecteurs modifiés présentant une plus faible compétence vectorielle. Cette modification de la compétence vectorielle peut se faire par des modifications génétiques comme l'expression du facteur de transcription *Rel2*-S qui active de nombreux gènes anti-*plasmodium* chez *An. gambiae* (Dong *et al.* 2011; Pike et Dimopoulos 2018). Cependant, à l'heure actuelle, aucune de ces lignées n'a été utilisée dans un programme de lutte antivectorielle, faute d'un manque d'information quant à l'interaction de ces lignées avec d'autres méthodes de lutte antivectorielle (Pike et Dimopoulos 2018). Les bactéries du genre *Wolbachia* ont également montré une capacité à réduire l'infection de plusieurs vecteurs par leurs pathogènes. Par exemple, ces bactéries peuvent diminuer l'infection des anophèles par *P. falciparum* ou l'infection des moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* par la Dengue et le virus Zika (Hoffmann *et al.* 2011; Bian *et al.* 2013; Chouin-Carneiro *et al.* 2020; Mancini *et al.* 2020).

2.3. Lutte physique

La lutte physique peut agir autant sur les larves que sur les imagos. Concernant les larves, il s'agit de réduire les gîtes larvaires en s'attaquant aux points d'eau stagnante. La lutte physique contre les imagos, encore à l'étude, pourrait se faire par l'utilisation de pièges attractifs pour les moustiques.

Les moustiques femelles pondant dans des eaux stagnantes, la réduction du nombre de sites de ponte permet donc de réduire les populations dans une localisation donnée. Dans les environnements urbains, les autorités locales vont recommander de réduire au maximum les potentiels réservoirs d'eau stagnante comme les vases, les coupelles, les pots de fleurs, les gouttières bouchées, etc… Dans les zones périurbaines ou rurales, l'étude de l'environnement permet d'identifier les points d'eau sensibles. Souvent, des modifications permanentes, comme l'assèchement des marais, sont privilégiées malgré le fait que de telles mesures entrainent généralement la disparition de zones humides. Toute action de l'homme doit être mesurée, car certaines modifications environnementales peuvent avoir l'effet inverse (Carnevale et Robert 2009; Wilson *et al*. 2020).

Les pièges à moustiques imagos peuvent prendre de nombreuses formes. Ils peuvent aller de la simple grille électrifiée couplée à une lampe UV à des pièges plus sophistiqués émettant des odeurs proches de celles de la peau humaine. D'autres pièges émettent du CO_2 couplé à un mélange de composés odorants attractants. Ces pièges exploitent le comportement du moustique qui localise l'hôte en suivant le CO_2 et les odeurs qu'il libère. Cependant, ces pièges nécessitent d'être alimenté en CO_2 au moyen de bouteilles pressurisées, avec de la glace carbonique ou par fermentation de sucre ou de mélasse (Mburu *et al.* 2017).

On peut également considérer certains équipements comme faisant partie de la lutte physique. Les grilles de portes et de fenêtres sont un dispositif simple qui permet de réduire fortement le contact hôte/vecteur si elles respectent certaines normes et si elles sont bien entretenues. Les trous des grilles ne doivent pas présenter des dimensions supérieures à 1,40mm sur 1,45mm (Carnevale et Robert 2009). Ces équipements, comme les moustiquaires non traitées, forment une barrière efficace contre les vecteurs s'ils sont bien utilisés.

2.4. Lutte chimique

2.4.1. Molécules utilisées en lutte chimique

a) Larvicides

Les larvicides chimiques ont une contrainte majeure, il ne faut pas qu'ils contaminent les eaux de boisson des humains et des animaux, ce qui réduit fortement leur champ d'utilisation. La classe d'insecticide neurotoxique privilégiée pour la lutte larvicide se trouve être les organophosphorés et plus particulièrement le téméphos. Cet insecticide présente l'avantage de pouvoir être utilisé pour traiter les eaux vivrières et même les eaux de boisson, car sa toxicité est très faible pour les mammifères. Il présente cependant les inconvénients d'être fortement toxique pour la faune aquatique (OMS 2014). Outre les larvicides neurotoxiques, des inhibiteurs de la croissance des larves sont aussi employés. Ces inhibiteurs peuvent être des analogues d'hormones juvéniles comme le pyriproxyfène ou bien des inhibiteurs de synthèse de la chitine de la classe des benzoylurées comme le diflubenzurone. Les inhibiteurs de synthèse de la chitine interfèrent dans le processus de mue des larves et les tuent à ce moment-là. Les analogues d'hormones juvéniles et les benzoylurées ont vu leur utilisation limitée à cause de leurs coûts élevés (OMS 2014). Aujourd'hui, l'OMS recommande l'utilisation de larvicides uniquement dans certaines conditions. Leur utilisation est indiquée lorsque les gîtes larvaires sont permanents, répertoriés, accessibles ou en cas de forte densité de population. De plus, l'utilisation de larvicide seule n'est pas recommandée. Cette mesure permet de réduire la densité de vecteur et doit être utilisée en complément des mesures adulticides (OMS 2021c).

b) Adulticides

La lutte chimique contre les imagos se fait au travers de trois méthodes principales : l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides, les pulvérisations intradomiciliaires (PID) et des pulvérisations spatiales (Carnevale et Robert 2009; OMS 2014, 2021c).

Les moustiquaires imprégnées font partie des mesures les plus recommandées par l'OMS et en particulier, les moustiquaires à imprégnation durable qui constituent une évolution par rapport aux moustiquaires imprégnées classiques. Dans ces premières, l'insecticide a été intégré au matériau constituant la moustiquaire ce qui permet d'éviter de devoir les réimprégner régulièrement. L'avantage de ce dispositif est qu'il empêche le contact hôte/vecteur tout en réduisant la population d'imagos par l'effet de l'insecticide. Les insecticides recommandés pour imprégner les moustiquaires sont issus de la classe des pyréthrinoïdes comme la deltaméthrine ou l'alpha-cyperméthrine (OMS 2014). Aujourd'hui, cette mesure représente le principal pilier de la lutte antipaludéenne dans le monde (OMS 2020b).

La pulvérisation intradomiciliaire consiste à appliquer des insecticides à l'intérieur des habitations sur toutes les surfaces disponibles. Cette mesure est recommandée seulement si l'espèce locale de vecteur est endophile (se posant à l'intérieur des habitations), si une surface importante des bâtiments peut être traitée et si on dispose de la technicité pour déposer la bonne quantité de produit. Cette mesure, pour être efficace, nécessite donc une bonne connaissance du terrain, l'assurance d'avoir un financement continu pour faire durer la mesure dans le temps et de mettre à disposition les moyens matériels et humains nécessaires (Carnevale et Robert 2009; OMS 2014). Le choix d'un insecticide pour les PID doit prendre en compte certains critères : la sensibilité des vecteurs locaux, la formulation, une rémanence longue afin d'éviter des applications trop

rapprochées ainsi qu'une innocuité pour les populations et la faune non-cible. Les classes d'insecticides préconisées dans les PID par l'OMS sont en majorité des pyréthrinoïdes, quelques carbamates, des organophosphorés et un organochloré (OMS 2014). Bien que cette mesure soit efficace pour réduire rapidement la transmission de certaines maladies, comme le paludisme ou la maladie de Chagas, seulement 2% de la population mondiale est protégé par cette mesure (OMS 2020b, 2021b).

La pulvérisation spatiale consiste à nébuliser une formulation d'insecticide afin de le répandre en extérieur. Son objectif est d'éliminer les moustiques par dispersion de l'insecticide dans l'air. La pulvérisation spatiale entraine une rapide diminution de la densité des populations de vecteurs, mais elle doit être réalisée de façon hebdomadaire pour avoir une bonne efficacité. L'OMS recommande principalement l'utilisation des pyréthrinoïdes pour la pulvérisation spatiale en intérieur comme en extérieur, mais également le malathion, un organophosphoré, pour un usage extérieur uniquement (OMS 2014).

c) Molécules à effet répulsif

Les répulsifs cutanés sont indiqués dans la protection des individus lors de déplacements dans des zones endémiques de pathologies vectorielles. Ils sont efficaces sur une durée déterminée et leur application doit être renouvelée régulièrement. Trois produits sont utilisés à l'heure actuelle : le DEET, l'IR3535 et l'icaridine.

Le DEET est le produit le plus largement répandu. Il est utilisé soit sous forme liquide, autant en spray qu'en lotion, soit en imprégnation de moustiquaire. La concentration recommandée pour un adulte est de 30% à 50% pour une durée d'action de 6h à 8h environ (Carnevale et Robert 2009). Cependant, cette molécule est aujourd'hui sujette à controverse. En effet, des études ont reporté des effets secondaires neurologiques et proangiogéniques, sur les systèmes circulatoires (bradycardie, hypertension) et cutanés (éruptions, dermatites, urticaire, etc…) (Vozmediano *et al.* 2000; Osimitz *et al.* 2010; Wiles *et al.* 2014; Legeay *et al.* 2018). L'IR3535 est utilisé de façon identique au DEET et confère approximativement la même durée d'efficacité. À dose équivalente, l'icaridine présente une durée d'action plus longue que le DEET contre certains insectes. Il est considéré comme inoffensif pour l'homme, mais par principe de précaution, il est recommandé de limiter son usage à une durée maximale d'un mois et d'éviter de l'utiliser chez les enfants de moins de 30 mois et les femmes enceintes (Santé Publique France 2020).

2.4.2. Mode d'action des insecticides neurotoxiques

a) Mode d'action des pyréthrinoïdes et du DDT

Les pyréthrinoïdes peuvent être classés en deux catégories, les pyréthrinoïdes de type I ou de type II, différenciées par la présence d'un groupement α-cyano-*3*-phenoxybenzyl dans la structure des pyréthrinoïdes de type II (Figure 2) (Raymond-Delpech *et al.* 2005; Davies *et al.* 2007; Soderlund 2012). Les deux classes de pyréthrinoïdes diffèrent aussi par les symptômes résultant d'un empoisonnement chez les mammifères. Les pyréthrinoïdes de type I peuvent provoquer, chez les mammifères, des tremblements, une hyperexcitabilité, une ataxie, des convulsions et une paralysie, alors que les pyréthrinoïdes de type II peuvent causer une choréoathétose, une salivation, une hypersensibilité, des mouvements involontaires et des convulsions (Raymond-Delpech *et al.* 2005). Chez les insectes, l'intoxication par les pyréthrinoïdes affecte le système nerveux central et périphérique. Les pyréthrinoïdes de type I provoquent des décharges répétées dans les axones

provoquant une incoordination et une hyperactivité suivie d'une paralysie. Les pyréthrinoïdes de type II entrainent une phase d'état convulsif conduisant à la paralysie. On parle d'effet « Knock-Down » (Davies *et al.* 2007).

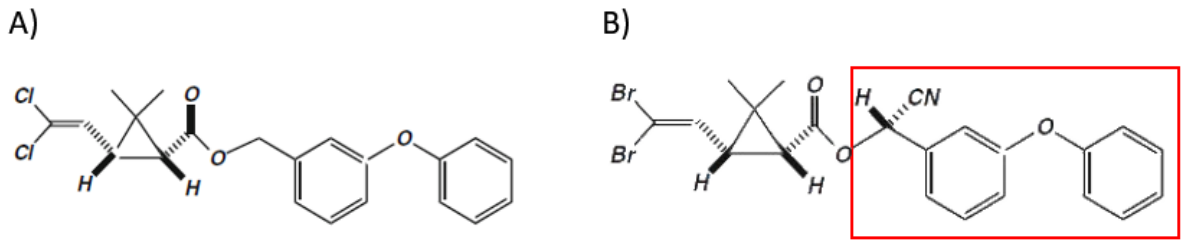

Figure 2 : Structure moléculaire A) d'un pyréthrinoïde de type I : la perméthrine et B) d'un pyréthrinoïde de type II : la deltaméthrine. En rouge est encadré le groupement α-cyano-3-phenoxybenzyl caractéristique des pyréthrinoïdes de type II. Modifiée d'après Soderlund 2012

Au niveau cellulaire, les pyréthrinoïdes agissent sur les cinétiques d'activation et d'inactivation des canaux Na_v conduisant à une augmentation de la durée des flux ioniques. En condition physiologique, un canal sodique dépendant du potentiel s'ouvre durant quelques millisecondes en réponse à une dépolarisation de la membrane. Il s'en suit un état d'inactivation, puis un état fermé et enfin un retour à l'état de repos. En se fixant sur les canaux Na_v, ces insecticides prolongent la durée d'ouverture du canal. Les différences d'effet physiologique induit par l'intoxication aux pyréthrinoïdes de type I ou de type II s'expliquent par la différence de durée de modification des canaux sodium causée par ces composés. Les pyréthrinoïdes de type I prolongent l'ouverture des canaux Na_v d'une durée moins longue que ceux de type II (Davies *et al.* 2007). Les pyréthrinoïdes de type I génèreront un courant de queue entrant d'une dizaine à une centaine de millisecondes. Cela conduira à une dépolarisation transitoire après le potentiel d'action et provoquera des décharges répétées de potentiels d'action conduisant à l'hyperexcitation observée. Les pyréthrinoïdes de type II maintiennent les canaux Na_v ouverts sur une plus longue durée pouvant aller jusqu'à plusieurs secondes. Il en résulte un courant de queue continu, maintenant la membrane dans un état relativement stable et anormal de dépolarisation. Cet état de dépolarisation constant conduira au blocage de la genèse de potentiels d'action. Cette incapacité à générer des potentiels d'action conduit à la paralysie (Davies *et al.* 2007; Soderlund 2012).

Même si les pyréthrinoïdes peuvent agir autant sur les canaux de mammifères que sur ceux des insectes, ils n'en restent pas moins considérés comme sélectifs pour les insectes et cela pour deux raisons : i) les canaux Na_v d'insecte présentent une sélectivité intrinsèque aux pyréthrinoïdes plus grande que ceux des mammifères et ii) l'efficacité des pyréthrinoïdes étant dépendante de la température, les pyréthrinoïdes sont plus actifs chez les insectes, car ils possèdent une température corporelle plus basse que les mammifères (Raymond-Delpech *et al.* 2005).

b) Mode d'action des organophosphorés et des carbamates

Les insecticides de la famille des organophosphorés et des carbamates ont pour cible l'acétylcholinestérase (AChE). Ces deux classes d'insecticides agissent sur le site catalytique de l'AChE, selon deux réactions chimiques différentes, dont la résultante est le blocage du site actif empêchant la dégradation de l'acétylcholine (ACh) (Kwong 2002).

Les organophosphorés tels que le chlorpyrifos-éthyl phosphorylent la sérine impliquée dans le site actif de l'AChE. En condition physiologique, ce résidu sérine permet la formation du complexe AChE-ACh conduisant à l'hydrolyse de l'ACh. La liaison entre le groupement phosphate de l'insecticide et la sérine de l'AChE est plus stable que celle se faisant entre cette sérine et le groupement acétyle de l'ACh. Cette liaison entre l'insecticide et l'AChE peut être hydrolysée, mais la cinétique de la réaction est très lente ce qui entraine un blocage de l'enzyme. De plus, en l'absence d'hydrolyse, le groupement phosphate restera définitivement attaché à l'AChE (Costa 2006). On parle de vieillissement du blocage (Figure 3A).

Les carbamates tels que le propoxur vont réaliser une réaction de carbamylation sur la même sérine que celle ciblée par les organophosphorés. Cette réaction consiste en un transfert d'un groupement carbamyl sur la chaine latérale de la sérine. Cependant, la carbamylation contrairement à la phosphorylation est plus facilement hydrolysable ce qui permet une régénération de l'AChE (Figure 3B). Cela confère aux carbamates la propriété d'avoir une action réversible (Kwong 2002).

Dans les deux cas, le blocage de l'activité enzymatique de l'AChE entrainera une accumulation de l'ACh dans la fente synaptique. Cette accumulation provoquera une stimulation excessive des récepteurs cholinergiques dans la fente synaptique provoquant la paralysie et la mort de l'insecte (Costa 2006).

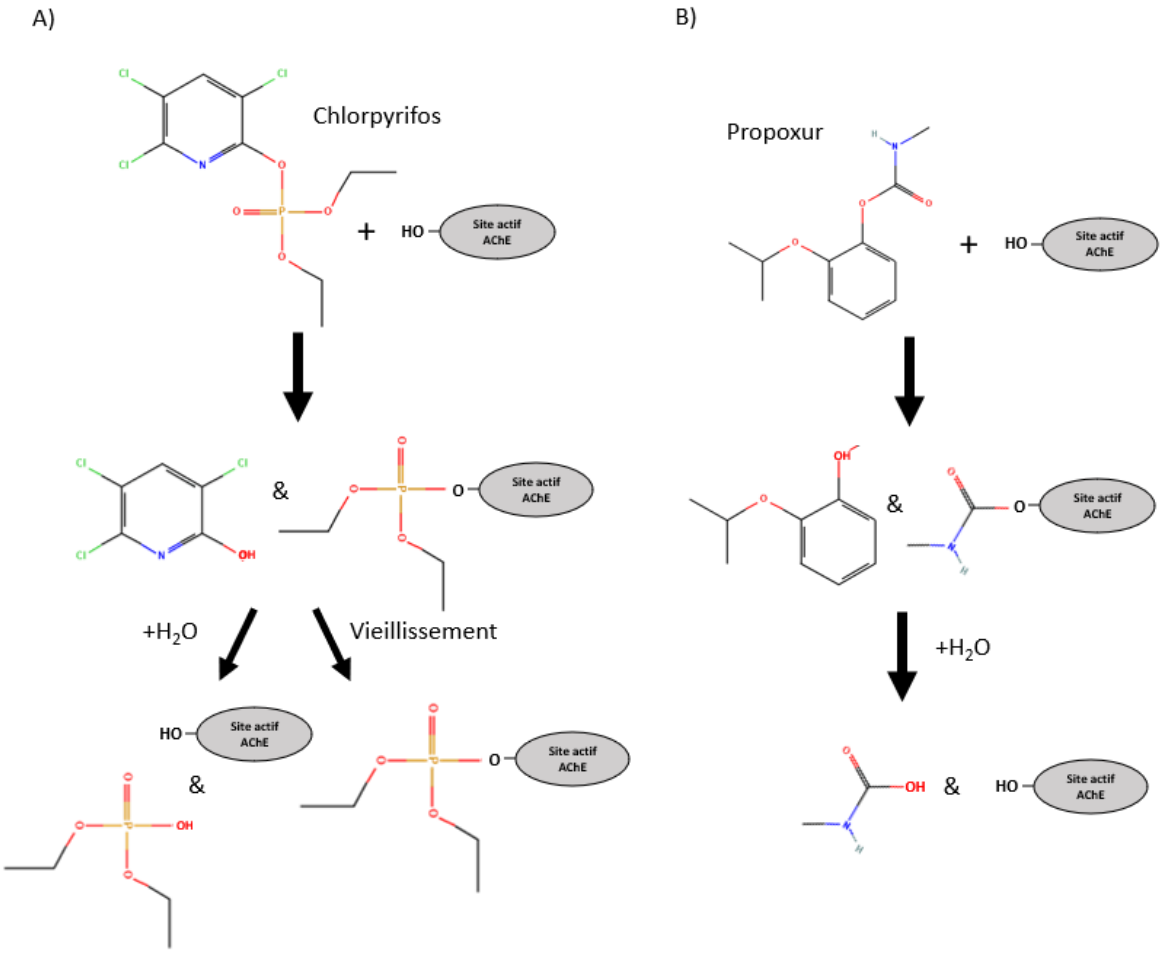

Figure 3 : Schéma représentant le mode d'action : A) d'un organophosphoré : le chlorpyrifos, B) d'un carbamate : le propoxur.

Chapitre 2 : Résistance et mécanismes modulant la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides

1. Résistance aux insecticides

1.1. Généralités

La lutte chimique a longtemps été et reste la méthode de lutte la plus employée contre les insectes nuisibles. Cependant, l'utilisation non raisonnée des insecticides au cours des dernières décennies a entrainé l'émergence de population d'insectes résistants. La définition de la résistance aux insecticides donnée par l'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) est la suivante : il s'agit d'un changement héréditaire de la sensibilité d'une population d'insecte à un insecticide, qui se traduit par l'échec répété du produit à atteindre le niveau de contrôle prévu lorsque celui-ci est employé conformément aux recommandations contre l'espèce d'insecte concernée (IRAC 2021).

Aujourd'hui, la recherche se concentre surtout sur la dispersion des résistances dans les populations, leur contrôle, mais aussi sur la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de ces résistances (Naqqash *et al.* 2016). En effet, l'exposition des populations d'insectes à des insecticides conduit à une pression de sélection favorisant les individus présentant des modifications de leur physiologie et/ou de leur biochimie leur permettant de diminuer l'impact des insecticides sur leur organisme. Ces changements sont souvent décrits d'un point de vue toxicodynamique et/ou toxicocinétique. Les mécanismes modulant la toxicocinétique, tels que les modifications de la pénétration de l'insecticide, de l'activation des composés, du métabolisme et particulièrement de la détoxication, du transport et de l'excrétion des molécules actives ou de leur précurseur, régulent la quantité de composés arrivant au contact de leurs cibles moléculaires. Les mécanismes régulant la toxicodynamie sont ceux induisant des changements au niveau de la cible moléculaire, comme des modifications structurales ou des modifications de leur expression (Van Leeuwen *et al.* 2020).

1.2. Mutations ponctuelles des cibles moléculaires des insecticides

Parmi les mécanismes modulant la toxicodynamie des insecticides, les modifications de la séquence protéique des cibles moléculaires entrainent des changements de la sensibilité de ces cibles. Ce mécanisme est observable tant au niveau de l'AChE dans la résistance aux carbamates et aux organophosphorés (OP) que dans les canaux Na_v dans la résistance aux pyréthrinoïdes. Au niveau de l'AChE de type 1 (AChE1), les mutations G119S chez le moustique et A201S chez le puceron permettent de diminuer la sensibilité de ces insectes aux carbamates et aux OP. La modélisation de la structure du site catalytique de l'AChE a permis de mettre en évidence que la mutation G119S se trouve au niveau du trou oxyanion du site actif de l'AChE1 et entraine une diminution de l'affinité de ces insecticides pour le site actif (Oakeshott *et al.* 2005; Alout *et al.* 2008). Une des formes de résistance aux pyréthrinoïdes et aux organochlorés se trouve être la résistance « Knock-down » ou *Kdr*. Elle consiste en une diminution de la sensibilité de l'insecte à ces molécules causée par une substitution d'un acide aminé dans la séquence du canal Na_v. Une des mutations les plus caractérisées est la substitution d'une leucine en position 1014 par un autre acide aminé. Cette mutation, d'abord mise en évidence chez la mouche

Musca domestica, est également responsable de la résistance *Kdr* chez *Anopheles gambiae.* Chez ce dernier, la leucine peut être substituée par une phénylalanine ou une sérine (Martinez-Torres *et al.* 1998; Rinkevich *et al.* 2013). Les mutations peuvent ne pas concerner qu'un seul acide aminé, mais elles peuvent se cumuler afin d'accroitre la résistance. Par exemple, la mutation L1014F a été retrouvée associée à une autre mutation : la mutation N1575Y (Jones *et al.* 2012). L'étude de cette mutation chez le moustique *Aedes aegypti* a permis de montrer que la mutation N1575Y seule n'entrainait pas de résistance aux pyréthrinoïdes. Cependant, cette mutation augmente la résistance aux pyréthrinoïdes causée par la mutation L1014F (Wang *et al.* 2015).

1.3. Résistance métabolique

La détoxication se définit par l'ensemble des mécanismes par lesquels un organisme inactive l'activité de composés toxiques et favorise leur élimination. Ces mécanismes impliquent majoritairement trois familles d'enzymes : les cytochromes P450, les estérases et les glutathion S-transférases. La détoxication se fait en deux phases. La première fait intervenir entre autres les cytochromes P450 et dans une moindre mesure les estérases. Elle consiste en une biotransformation des composés en métabolites pouvant être moins toxiques. La seconde phase consiste en une conjugaison d'un radical hydrosoluble aux métabolites issus de la phase 1. Les glutathion S-transférases peuvent par exemple catalyser la conjugaison d'un glutathion à un métabolite lors de cette phase. Cela a pour objectif de permettre son élimination par excrétion (Liska 1998; Liu 2015).

Les cytochromes P450 (P450) sont des monooxygénases intervenant dans le métabolisme oxydatif de molécules très variées. Cette superfamille d'enzyme est une des plus larges et a été décrite dans une grande variété d'organismes. Elle joue un rôle majeur dans la détoxication des xénobiotiques comme les insecticides, mais également dans la biosynthèse et la dégradation de composés endogènes comme les phéromones ou les hormones juvéniles (Liu *et al.* 2015). Une augmentation de l'expression et de l'activité des P450 est impliquée dans les phénomènes de résistance aux insecticides par une augmentation du métabolisme de détoxication. Par exemple, les CYP6, une sous-famille de P450, sont associés à des résistances métaboliques (Liu et Scott 1998; Liu *et al.* 2015; Vontas *et al.* 2020). Chez la mouche *Musca domestica*, les CYP6A1 et CYP6D1 sont surexprimés dans des souches résistantes aux pyréthrinoïdes (Cariño *et al.* 1994; Liu et Scott 1998). Chez le moustique *Anopheles gambiae*, les CYP6P3 et CYP6M2 sont surexprimés dans de nombreuses populations d'insectes résistants. Ces deux cytochromes sont capables de métaboliser la perméthrine et la deltaméthrine, deux des pyréthrinoïdes majoritairement utilisés en LAV. Le CYP6Z1 est lui, surexprimé chez des populations d'anophèles résistantes à la fois au DDT et aux pyréthrinoïdes (David *et al.* 2013). Les cytochromes P450 peuvent également agir sur les métabolites secondaires issus d'une première biotransformation de l'insecticide. Chez *An. gambiae*, par exemple, le CYP6Z2 est capable de métaboliser l'alcool 3-phénoxybenzoique et le 3-phénoxybenzaldéhyde, des métabolites secondaires produits par la dégradation de pyréthrinoïdes par des carboxylestérases (David *et al.* 2013).

Les carboxylestérases forment une superfamille d'enzymes qui participe à la première phase de détoxication des xénobiotiques. Ces enzymes hydrolysent les liaisons ester de composés en générant deux métabolites : un acide carboxylique et un alcool (Montella *et al.* 2012). Les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes sont les principales classes d'insecticides métabolisées ou séquestrées par ces enzymes (Sogorb et Vilanova 2002). Comme pour les cytochromes P450, la surexpression des carboxylestérases peut être constitutive ou régulée par un phénomène d'induction (Feng *et al.* 2018). Une surexpression de ces enzymes a

été mise en évidence dans le cadre de la résistance métabolique. Par exemple, chez les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*, les carboxylestérases CCE*ae3a* et CCE*ea6a* sont surexprimées dans des populations résistantes au téméphos, un organophosphoré utilisé comme larvicide (Poupardin *et al.* 2014; Grigoraki *et al.* 2017). Une étude récente a montré que chez une souche de mouche *Musca domestica* résistante aux pyréthrinoïdes, 8 carboxylestérases présentaient une surexpression constitutive. Ces travaux ont également mis en évidence qu'une exposition à la perméthrine de ces mouches résistantes induisait une surexpression de ces enzymes plus importante que chez les mouches résistantes non exposées (Feng *et al.* 2018).

Les glutathions S-transférases (GST) sont des enzymes catalysant la fixation de groupement glutathion sur des métabolites secondaires afin de les solubiliser et de favoriser leur excrétion. Cette réaction se fait au moyen de deux sites, un site G qui se fixe au glutathion et un site H qui se lie au substrat. La variabilité du site H permet une grande diversité des substrats pouvant y être fixés (Ortelli *et al.* 2003). Une augmentation de l'activité des GST a été associée à une résistance aux insecticides. Par exemple, la GSTe8 est surexprimée chez une souche de mouche *Bactrocera dorsalis* résistante à l'organophosphoré malathion. Chez cette mouche, la GSTe8 est impliquée dans la détoxication de cet insecticide (Lu *et al.* 2020). Chez *An. gambiae*, une augmentation de la déhydrochlorination du DDT permet de conférer au moustique une résistance à cet insecticide (Enayati *et al.* 2005). Par exemple, il a été montré que la GSTe2 était surexprimée chez les anophèles résistants au DDT et que cette enzyme présente la plus haute activité déhydrochlorinase pour ce composé (Enayati *et al.* 2005).

1.4. Altération de la pénétration des insecticides au niveau de la cuticule

La cuticule sert à la fois de peau et de structure rigide aux insectes. Son agencement permet la locomotion, l'étanchéité de leur organisme, mais aussi leur résistance aux parasites et aux agents chimiques ou biologiques (Vincent et Wegst 2004). C'est aussi une des voies d'entrée des insecticides dans leur organisme. La cuticule est formée de plusieurs couches superposées. La couche externe, l'épicuticule, est majoritairement composée d'hydrocarbures, de protéines et de lipides. La couche intermédiaire, appelée procuticule, peut être subdivisée en deux parties : l'exocuticule et l'endocuticule. L'exocuticule est dure alors que l'endocuticule est molle. La procuticule est principalement constituée de chitine, de polyphénols, d'eau et de protéines (Vincent et Wegst 2004). Les protéines cuticulaires représentent un grand nombre de gènes. Chez *An. gambiae*, les gènes codants pour les protéines cuticulaires représentent 2% de la totalité des gènes codants (Balabanidou *et al.* 2018). Sous l'endocuticule, une monocouche de cellules épidermales recouvrant intégralement l'insecte est responsable de la sécrétion de la cuticule (Vincent et Wegst 2004). Les modifications cuticulaires permettant une résistance aux insecticides impliquent principalement : un épaississement de celle-ci ou une modification de sa composition (Balabanidou *et al.* 2018).

Deux mécanismes ont été mis en évidence dans l'épaississement de la cuticule. Chez une souche d'*An. gambiae* résistante à toutes les classes d'insecticides, la souche Tiassale provenant de Côte d'Ivoire, il a été mis en évidence un épaississement de la cuticule entrainant un ralentissement de la pénétration de la deltaméthrine. L'observation au microscope électronique de tranches de cuticule a montré que seule l'épicuticule était épaissie. L'analyse de sa composition a montré que cet épaississement était dû à une hausse de la quantité d'hydrocarbure cuticulaire (Balabanidou *et al.* 2016). Cette augmentation a été reliée à une hausse de l'expression de 2 cytochromes P450 : CYP4G16 et CYP4G17. Ces cytochromes P450, impliqués dans la dernière étape de la

biosynthèse d'hydrocarbures cuticulaires, réalisent une étape de décarbonylation permettant de passer d'un aldéhyde à longue chaine carbonée à un alcane ou un alcène à longue chaine carbonée (Qiu *et al.* 2012). Au sein d'autres populations d'anophèles, l'épaississement de la cuticule se fait par l'augmentation de l'expression de certaines protéines. Une surexpression des protéines cuticulaires, comme CPLCG3, CPLCG4 et CPLC8, a été retrouvée chez des populations présentant une procuticule plus épaisse leur conférant un ralentissement de la pénétration des pyréthrinoïdes ou du DDT (Awolola *et al.* 2009; Nkya *et al.* 2014; Yahouédo *et al.* 2017; Balabanidou *et al.* 2018).

Des modifications de la composition de la cuticule peuvent aussi jouer un rôle dans la résistance aux insecticides. Les protéines ABC (ATP-binding cassette) sont des transporteurs membranaires fonctionnant grâce à l'hydrolyse de deux ATP. Elles composent une des plus grandes classes des transporteurs membranaires et existent partout dans le règne animal. Leur rôle le plus connu est le transport de molécules du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, mais elles ont aussi été décrites comme jouant un rôle de canal ionique ou de récepteur. Ces protéines sont capables de transporter de nombreux types de composés : des ions, des sucres, des lipides, des métabolites toxiques ou des xénobiotiques (Dermauw et Van Leeuwen 2014). Chez les insectes, les transporteurs ABC ont notamment été mis en cause dans la pigmentation de l'épiderme et le transfert de lipides dans la cuticule. Chez *An. gambiae*, 55 gènes codant pour des transporteurs ABC ont été mis en évidence. Chez certaines souches résistantes aux pyréthrinoïdes, une augmentation de l'expression de certains de ces transporteurs, notamment ceux de la famille G (ABCG), a été mise en évidence. Puisque les ABCG ont été mis en évidence dans la cuticule des pattes et de l'abdomen du moustique et ont été décrits comme jouant un rôle dans le transport de lipides depuis l'épiderme vers la cuticule chez le ténébrion *T. castaneum* (Broehan *et al.* 2013), une hausse de ces transporteurs dans la cuticule pourrait être responsable d'une diminution de la pénétration des pyréthrinoïdes au travers de la cuticule. Cependant, ce rôle n'a pas été confirmé et des études plus approfondies sont nécessaires (Balabanidou *et al.* 2018; Pignatelli *et al.* 2018).

1.5. Séquestration des insecticides

Afin d'être efficaces, les insecticides neurotoxiques doivent diffuser dans l'organisme de l'insecte et atteindre leurs cibles sur les neurones. La séquestration des insecticides ou de leurs métabolites toxiques par des protéines permet d'augmenter la résistance aux insecticides en réduisant la quantité de molécules atteignant leur cible moléculaire. Les protéines sensorielles d'appendices (SAP : « sensory appendage protein ») font partie de la famille des protéines chémosensibles (CSP : « chemosensory protein »). Ce sont de petites protéines impliquées dans le transport de composés hydrophobes dans la lymphe des sensilles. Une étude récente a montré, chez la souche Tiasallé d'*An. gambiae* résistante aux pyréthrinoïdes, une surexpression des protéines SAP2 et CSP6 dans les tissus des pattes, de la tête et des antennes, mais aussi dans le tube digestif et les tubules Malpighiens. Ces parties du corps dans lesquelles a lieu la détoxication correspondent aux extrémités qui sont en contact avec les moustiquaires imprégnées (Ingham *et al.* 2020). L'extinction de l'expression de ces gènes par l'ARN interférence a permis de restaurer la sensibilité de cette souche à divers pyréthrinoïdes comme la deltaméthrine. Ces protéines présentent une forte affinité pour les pyréthrinoïdes. Leur affinité pour ces insecticides est similaire à celle des cytochromes P450 CYP6M2 et CYP6P3 impliqués dans la dégradation de ces insecticides. Au vu de ces données, les auteurs ont formulé l'hypothèse que SAP2 et CSP6 agiraient en séquestrant directement les pyréthrinoïdes, prévenant ainsi leur action sur le système nerveux et favorisant leur détoxication.

Cependant, la part de l'implication de ce mécanisme dans la résistance aux pyréthrinoïdes reste à déterminer (Ingham *et al.* 2020).

1.6. Comportements d'évitement

La définition des comportements d'évitement est la suivante : il s'agit de la capacité d'un insecte à s'éloigner d'une zone préalablement traitée avec un insecticide (Chareonviriyaphap *et al.* 2013). Ce type de réponse peut être sous-divisé en deux catégories. La première, parfois appelée « irritation », implique que l'insecte ne fuit une zone traitée qu'après s'être posé sur celle-ci. La seconde, parfois appelée « répulsion spatiale », consiste en une fuite de l'insecte avant même qu'il ne se soit posé sur la zone traitée (Chareonviriyaphap *et al.* 2013). Des études menées en Thaïlande ont montré que lorsque des moustiques de diverses espèces (*An. minimus*, *An. harrisoni, Ae. aegypti, Cx. quinquefaciatus*…) se posent sur une surface traitée avec des insecticides de la classe des pyréthrinoïdes (deltaméthrine, perméthrine, tetraméthrine…), ces derniers manifesteraient un comportement de fuite rapide (Chareonviriyaphap *et al.* 2013).

2. Mécanismes modulant la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides

La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires modulant la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides est essentielle afin, d'une part d'adapter les stratégies de contrôles aux résistances rencontrées, et d'autre part de pouvoir développer de nouvelles stratégies pour optimiser les traitements de lutte actuels et contourner ces résistances aux insecticides. Outre les mécanismes de résistance, de nombreux facteurs peuvent moduler la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides. Il peut s'agir de mécanismes modifiant la séquence des ARN messagers codants pour ces cibles (épissage alternatif, édition d'ARN…), d'une modification de la composition en sous-unités de la cible ou bien de la modulation de la sensibilité de la cible par l'action de voies de signalisation (Figure 4) (Raymond *et al.* 2017).

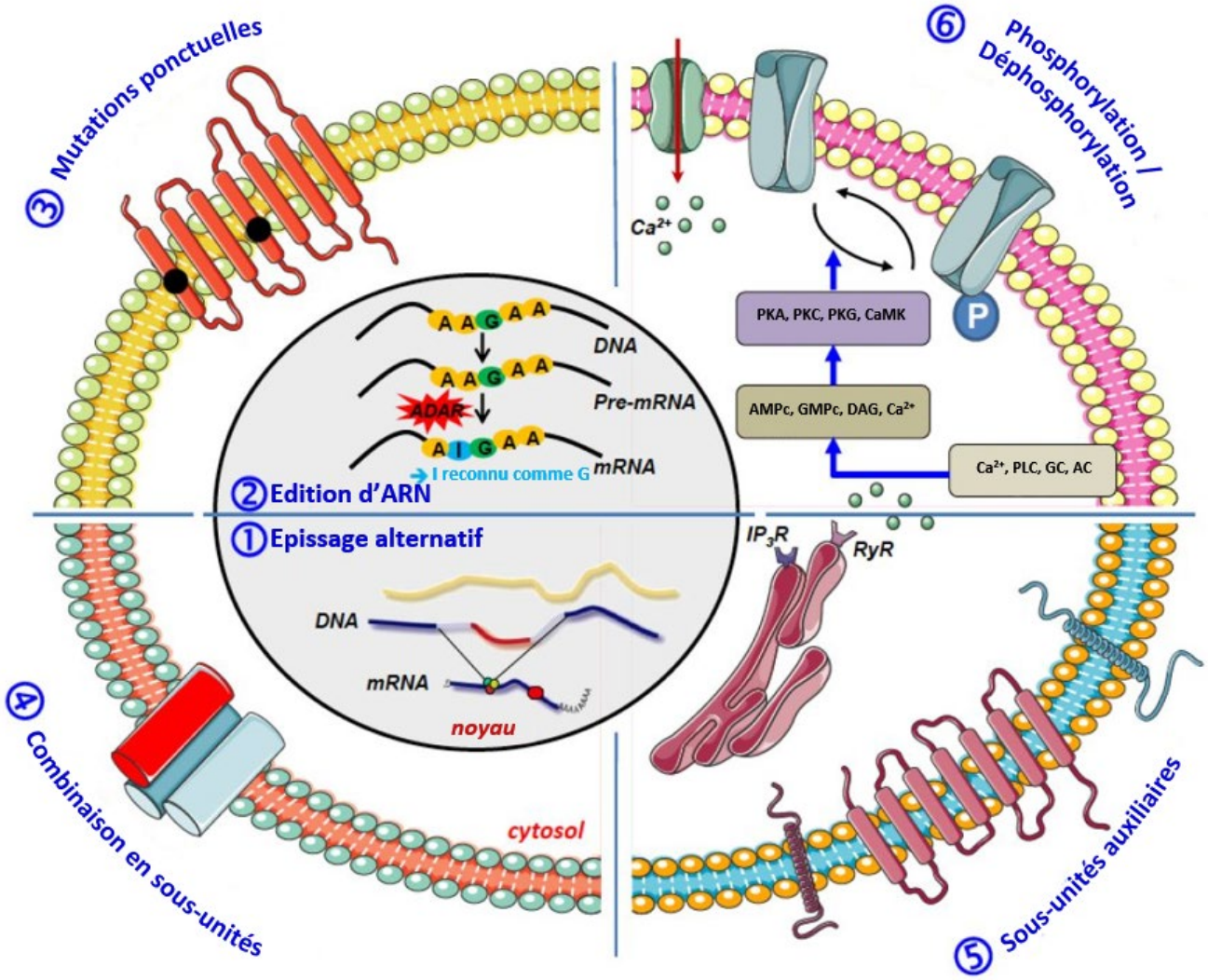

Figure 4 : Schéma récapitulatif des mécanismes cellulaires et moléculaires régulant la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides. Modifié d'après Raymond *et al*. 2017.

2.1. Mécanismes impactant la structure moléculaire des cibles des insecticides

La sensibilité d'une cible moléculaire pour un insecticide dépend de l'organisation moléculaire de celle-ci au niveau du site actif de l'insecticide. Cette organisation moléculaire dépend de la séquence de la protéine en elle-même et/ou de la composition en sous-unités de la cible.

2.1.1. Composition en sous-unités

Certaines cibles moléculaires des insecticides sont composées de plusieurs sous-unités, notamment les récepteurs à l'acide γ-aminobutyrique (GABA) ou les récepteurs nicotiniques (nAChRs). La composition en sous-unités influe sur leur pharmacologie.

L'impact de la composition en sous-unités sur la sensibilité aux insecticides a été particulièrement étudié sur les récepteurs nicotiniques (Raymond *et al.* 2017). Les nAChRs sont des récepteurs composés d'un assemblage de 5 sous-unités pouvant être identiques (récepteurs homomériques) ou différentes (récepteurs hétéromériques). Ces sous-unités peuvent être de types α ou β. L'étude de l'affinité des nAChRs pour un néonicotinoïde, l'imidaclopride, en fonction de leur composition en sous-unités a été menée, entre autres, chez la cicadelle *Nilaparvata lugens*, la mouche *Drosophila melanogaster* et la blatte *Periplaneta americana* (Liu *et al.* 2005; Li *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2015; Sun *et al.* 2017; Perry *et al.* 2021).

Chez *N. lugens*, 10 sous-unités, 8 α et 2 β (notées *Nl*α1-*Nl*α8, *Nl*β1 et *Nl*β2) ont été caractérisées. Des expériences de liaison de ligand aux nAChRs réalisées sur des préparations de membranes de cellules de *N. lugens* ont mis en évidence deux sites de fixation au niveau des nAChRs ayant une affinité différente pour l'imidaclopride (Liu *et al.* 2005; Li *et al.* 2010). L'imidaclopride tritiée utilisée conjointement avec des expériences de co-immunoprécipitation a permis de mettre en évidence que le site ayant la plus haute affinité est composé des sous-unités *Nl*α3/*Nl*α8/*Nl*β1 alors que celui présentant une affinité moindre est formé des sous-unités *Nl*α1/*Nl*α2/*Nl*β1 (Li *et al.* 2010). Une diminution de l'expression de *Nl*α8 a été observée au sein d'une population de *N. lugens* résistante aux néonicotinoïdes. De plus, une diminution de l'expression de *Nl*α8 par ARN interférence chez une population de *N. lugens* sensible à l'imidaclopride a entrainé l'apparition d'une résistance à cet insecticide (Zhang *et al.* 2015). Ces résultats suggèrent que la diminution de l'expression de la sous-unité *Nl*α8, qui entre dans la composition des nAChRs présentant la plus haute affinité pour l'imidaclopride, conduirait à la mise en place de mécanismes de résistance vis-à-vis de l'imidaclopride chez *N. lugens*.

Chez la blatte *Periplaneta americana*, 19 sous-unités dont 9 α et 10 β (notées *Pa*α1-*Pa*α9 et *Pa*β1-*Pa*β10) ont été caractérisées (Jones *et al.* 2021). Deux types de nAChRs ont été mis en évidence dans les neurones dorsaux impairs médians appelés neurones DUM (Dorsal Unpaired Median) qui se distinguent par leur sensibilité à l'α-bungarotoxine (α-Bgt). Parmi les nAChRs insensibles à l'α-Bgt, on retrouve 2 sous-types, les nAChR1 et les nAChR2. Ces récepteurs se différencient par rapport à leur pharmacologie et également par leur sensibilité vis-à-vis d'un néonicotinoïde : l'imidaclopride. Plus précisément, les nAChR2 sont insensibles à l'imidaclopride contrairement aux nAChR1 (Courjaret et Lapied, 2001). Grâce à la technique d'ARN interférence couplée à la technique de patch-clamp, il a été montré que les sous-unités *Pa*α3, *Pa*α8 et *Pa*β1 entreraient dans la composition du sous-type nAChR1 alors que le sous-type nAChR2 serait composé des sous-unités *Pa*α1, *Pa*α2 et *Pa*β1 (Sun *et al.* 2017). Ainsi, les résultats observés chez la blatte sont similaires à ceux décrits chez *N. lugens*. Cela suggère que les sous-unités α3, α8 et β1 jouent un rôle dans la sensibilité des nAChRs à l'imidaclopride.

Chez *D. melanogaster*, 10 gènes codant pour 7 sous-unités α et 3 sous-unités β (notées *D*α1-*D*α7 et *D*β1-*D*β3) ont été mis en évidence dans le génome (Sattelle *et al.* 2005). Des travaux récents utilisant la technique d'édition génétique CRISPR/Cas9 ont étudié l'impact de la délétion de 9 sous-unités chez des larves de drosophiles sur leur sensibilité à plusieurs insecticides. Il a été montré que la délétion génomique de la sous-unité *D*α6 confère aux drosophiles une résistance au spinosad, un insecticide de la famille des spinosynes. Les drosophiles, n'exprimant pas *D*α6, survivent à des doses de spinosad 2106 fois plus élevées que celles exprimant *D*α6 (Perry *et al.* 2021). Ces résultats suggèrent que la sous-unité *D*α6 joue un rôle dans la sensibilité des nAChRs au spinosad. Ainsi, une diminution ou une augmentation de l'expression de cette sous-unité pourrait moduler la sensibilité de l'insecte au spinosad.

2.1.2. Épissage alternatif

L'épissage alternatif est un mécanisme entrainant la production de variants issus de la maturation des transcrits d'un même gène. Ces variants diffèrent les uns des autres par l'inclusion ou non d'exons dans la séquence lors de la maturation des ARNm. L'inclusion ou l'exclusion d'exons dans la séquence nucléotidique entraine une modification de la séquence protéique. Ces modifications de la séquence peuvent moduler la sensibilité d'un récepteur à un composé. L'influence de l'épissage alternatif sur la sensibilité du canal sodique dépendant du potentiel (Na_v) à l'insecticide pyréthrinoïde deltaméthrine est un exemple.

Chez les insectes, le canal Na_v est codé par un seul gène, le gène *para*, mais l'épissage alternatif de son ARNm permet de produire de nombreux variants. Par exemple, chez *D. melanogaster*, 15 exons sont présents au niveau du gène *para*. Onze sont optionnels et codent pour des régions au niveau des boucles intracellulaires (exons *a, b, e, f, h, i, j*, 7, 8, 22 et 23) et 4 sont appariés, mutuellement exclusifs (exons *c*/*d* et *k*/*l*). Ces derniers sont situés dans une région de l'ARNm codant pour des segments transmembranaires (Sun *et al.* 2019). Les exons *k* et *l* chez la drosophile correspondent aux exons *k* et *l* chez la cicadelle *Nilaparvata lugens* et aux exons G2 et G1 chez la blatte *Blattella germanica* respectivement. L'expression des canaux Na_v d'insectes dans des ovocytes de xénope a permis l'étude de la sensibilité des différents variants à la deltaméthrine en fonction des exons qu'ils ont incorporés. Ainsi, il a été mis en évidence que les variants contenant l'exon *l* (ou G1) sont plus sensibles à la deltaméthrine que ceux ayant incorporé l'exon *k* (ou G2) (Tan *et al.* 2002; Sun *et al.* 2019; Thompson *et al.* 2020). Par exemple, chez *D. melanogaster,* les canaux Na_v comportant l'exon *l* sont 20 fois plus sensibles à la deltaméthrine que ceux ayant intégré l'exon *k* (Thompson *et al.* 2020).

2.1.3. Edition d'ARN

L'édition d'ARN est un mécanisme de modification post-transcriptionnel des ARNm. Il permet en modifiant ceux-ci de créer une certaine diversité à partir d'une même séquence codante. Ce mécanisme consiste en une modification biochimique de certaines bases au sein des ARN messagers immatures entrainant un changement de nucléotide (Grau-Bové et Weetman 2020). Le mécanisme le plus commun est l'édition d'adénosine en inosine (A en I) réalisée par les enzymes adénosine désaminases de la famille d'enzymes ADAR (Savva *et al.* 2012). Lors de la traduction, les inosines seront interprétées comme des guanosines. D'autres types d'édition d'ARN existent, comme l'édition de cytosine en uridine (C en U) réalisée par les cytosine désaminases APOBEC (Blanc et Davidson 2010). Ces deux mécanismes sont régulés par des réactions de désamination. Des réactions de transamination G en A et U en C ont aussi été décrites (Gerber et Keller 2001). Ces modifications de l'ARN peuvent avoir plusieurs

conséquences selon le type d'ARN qu'elles touchent et selon l'emplacement de la modification. Elles peuvent induire des mutations non silencieuses, altérer les sites d'épissage alternatif, altérer les sites de fixation de miRNA ou encore altérer les miRNA eux-mêmes (Savva *et al.* 2012). Cela pourra créer des isoformes d'une même protéine ou bien moduler l'expression de ces protéines. Chez les insectes, l'étude de l'impact de l'édition d'ARN sur la sensibilité aux insecticides a été principalement menée sur 3 cibles moléculaires : les récepteurs ionotropes à l'acide γ-aminobutyrique (GABA), les récepteurs nicotiniques et les canaux sodiques dépendants du potentiel (Grau-Bové et Weetman 2020). Ici, nous prendrons l'exemple des récepteurs ionotropes GABAergiques (GABAR).

Les récepteurs ionotropes à l'acide γ-aminobutyrique font partie de la famille des récepteurs à boucle dicystéine ou « cys-loop » comme les récepteurs nicotiniques. Ils sont formés de 5 sous-unités et peuvent être homériques ou hétéromériques. Chez *D. melanogaster*, trois sous-unités ont été décrites : RDL, GRD et LCCH3. La sous-unité RDL est la plus étudiée. Son expression dans des ovocytes de xénope permet son assemblage en un récepteur homomérique fonctionnel nommé récepteur RDL (Ffrench-Constant *et al.* 1993). Ces récepteurs RDL sont la cible de plusieurs insecticides comme la dieldrine et le fipronil, mais également d'un médicament antiparasitaire : l'ivermectine (Grau-Bové et Weetman 2020). Dans la séquence de la sous-unité RDL de drosophile, un site d'édition d'ARN A en I est présent sur l'ARN codant pour cette sous-unité dans la partie N terminale extracellulaire. L'action d'une protéine ADAR sur ce site conduit au remplacement d'une arginine par une glycine lors de la synthèse protéique. Cette mutation R122G entraine une diminution de la sensibilité des récepteurs RDL au fipronil (Es-Salah *et al.* 2008). Chez *Anopheles gambiae*, l'ARNm de la protéine RDL présente six sites d'édition d'ARN A en I entrainant des substitutions lors de la traduction : R119G, I162V, I176V, N183G, I278V et N289D. L'expression des variants dans des ovocytes de xénope a montré que ces mutations, peu importe leur combinaison, n'ont aucun effet sur la sensibilité des récepteurs RDL au fipronil. En revanche, la sensibilité des récepteurs RDL à l'ivermectine, un médicament antiparasitaire qui, lorsqu'il est présent dans le sang humain, est mortel pour *An. gambiae* (Chaccour *et al.* 2010), est modifiée chez les isoformes ayant subi des éditions de leur ARN. Par exemple, l'ivermectine agit comme un antagoniste sur les courants induits par des concentrations de GABA supérieures à l'EC_{50}. L'IC_{50} de l'ivermectine pour les récepteurs RDL non modifiés (IC_{50} = 457±118nM) est significativement plus élevé que l'IC_{50} pour les récepteurs RDL présentant les 6 modifications par édition (IC_{50} = 50±24nM). A des concentrations plus faibles de l'ordre de 10nM et 30nM, l'ivermectine potentialise les courants des récepteurs RDL non modifiés induits par le GABA (EC_{20}). Cependant, lorsque les modifications N183G ou I278V sont présentes, cet effet potentialisateur de l'ivermectine est aboli (Taylor-Wells *et al.* 2018).

2.2. Rôle des protéines auxiliaires sur l'efficacité des insecticides

La densité des cibles moléculaires à la membrane peut entrainer des modifications de leur sensibilité aux insecticides. Cette densité peut être modulée par des protéines auxiliaires. Outre leur rôle dans l'adressage des protéines à la membrane, les protéines auxiliaires peuvent également moduler les propriétés biophysiques des canaux et des récepteurs canaux à la membrane. Dans cette partie, nous prendrons pour exemple les sous-unités auxiliaires des canaux Na_V.

Chez *D. melanogaster*, 5 sous-unités auxiliaires des canaux Na_V ont été caractérisées : la protéine TipE et les protéines de la famille TEH : TEH1 - TEH4. La co-expression de ces sous-unités auxiliaires avec une sous-unité principale des Na_V de drosophile, comme *Dm*Na_V1.1, dans des ovocytes de xénope a permis d'étudier leur impact sur l'adressage et les propriétés électrophysiologiques de la sous-unité principale. Lorsque les protéines

TipE et TEH1 - TEH3 sont exprimées conjointement avec *Dm*Na$_v$1.1, une augmentation de l'amplitude du courant sodique a été observée. De plus, ces protéines modulent les cinétiques d'activation et d'inactivation des canaux Na$_v$. Le mode d'action exact de ces protéines reste méconnu. Elles agiraient soit comme des protéines chaperonnes qui assureraient le bon repliement du canal Na$_v$ dans la membrane, soit en adressant la sous-unité principale à la membrane (Derst *et al.* 2006; Bourdin *et al.* 2013). Le canal *Dm*Na$_v$1.1 a été exprimé avec l'un ou l'autre des variants analogues de TEH1 de *P. americana* : *Pa*TEH1A et *Pa*TEH1B. L'amplitude des courants enregistrés lorsque le canal Na$_v$ est activé est plus importante en présence de ces deux sous-unités. Cependant, cette augmentation est moins importante en présence de *Pa*TEH1B qu'en présence de *Pa*TEH1A. Le DCJW, le métabolite actif de l'indoxacarbe, un insecticide de la classe des oxadiazines, bloque de façon irréversible les canaux Na$_v$. Lorsque le *Dm*Na$_v$1.1 est co-exprimé avec *Pa*TEH1A, il présente une moins grande sensibilité au DCJW, que lorsqu'il est co-exprimé avec *Pa*TEH1B ou avec TEH1 de la drosophile (Bourdin *et al.* 2013). Ainsi, l'ensemble de ces données souligne que les sous-unités auxiliaires jouent un rôle important dans l'efficacité des insecticides.

2.3. Modulation de la sensibilité des cibles aux insecticides par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation

La phosphorylation et la déphosphorylation sont des mécanismes majeurs dans la régulation de l'activité des protéines. Selon l'état de phosphorylation des cibles moléculaires des insecticides, il peut être observé une augmentation ou une diminution de : i) leur affinité pour un ligand, ii) l'efficacité de leur activité enzymatique ou bien encore iii) leur capacité à interagir avec un effecteur biochimique. De nombreuses molécules participent aux différentes voies de signalisation cellulaires conduisant à la phosphorylation ou la déphosphorylation d'une protéine. Il peut s'agir d'enzymes comme les kinases et les phosphatases qui sont les enzymes effectrices. Il peut aussi s'agir de lipides ou de seconds messagers comme l'AMPc ou le calcium qui peuvent moduler les voies de signalisation régulant l'activité des kinases et phosphatases (Raymond *et al.* 2017). L'étude de l'impact de la phosphorylation/déphosphorylation a été menée sur plusieurs types de cibles aux insecticides comme les nAChRs, les GABAR ou l'AChE.

La séquence des nAChRs de nombreuses espèces d'insectes présente des sites de phosphorylation à la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase G (PKG) ainsi qu'à la protéine kinase C (PKC) (Thany *et al.* 2007). Les neurones dorsaux médians impairs (DUM) du dernier ganglion abdominal de la blatte *P. americana* sont utilisés pour étudier le mode d'action des insecticides. Une étude menée sur ces neurones a permis de mettre en évidence une voie de signalisation permettant de moduler la sensibilité des nAChRs aux néonicotinoïdes par des mécanismes de phosphorylation (Courjaret et Lapied 2001). Il a ainsi été montré qu'une hausse de la concentration en calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) active le complexe calcium/calmoduline (CaM). Cela entrainerait une augmentation de l'activité d'une adénylate cyclase produisant une hausse de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) cytosolique permettant d'activer une PKA. Cette PKA irait phosphoryler un nAChR, nommé nAChR1 et entrainerait une augmentation de la réponse à l'imidaclopride (Courjaret et Lapied 2001). Cette même étude a également montré qu'une forte augmentation de la concentration en AMPc entraîne l'activation d'une phosphatase par un complexe calcium/protéine kinase II dépendante de la calmoduline (CaMKII). Cette phosphatase déphosphorylera le récepteur nicotinique nAChR1 et contrebalancera l'activité de la PKA en cas de hausse trop importante de l'AMPc cytosolique (Courjaret et Lapied 2001). D'autres études, menées sur ce modèle

cellulaire, ont montré que l'effet agoniste sur les nAChRs d'un autre néonicotinoïde, la clothianidine, est modulé de façon similaire. L'application de fortes concentrations de clothianidine (10^{-3}M) est associée à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ conduisant à la hausse de la concentration en AMPc. Cela entrainera l'activation de PKA phosphorylant les nAChR1 et nAChR2 et conduira à une augmentation du courant induit par la clothianidine. A de faibles concentrations de clothianidine (10^{-5}M), la hausse de calcium n'est pas suffisante et n'entraine pas l'activation de cette voie de signalisation. Ainsi, à de fortes concentrations, la clothianidine potentialise son effet *via* une voie de signalisation conduisant à la phosphorylation des nAChR1 et nAChR2 (Calas-List *et al.* 2013).

La modulation de la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides par la phosphorylation/déphosphorylation ne concerne pas que les néonicotinoïdes. Le fipronil est un insecticide de la classe des phénylpyrazoles qui cible les récepteurs ionotropes au GABA. Chez la blatte *P. americana*, dans les neurones DUM, il existe deux sous-types de récepteurs ionotropes au GABA appelés : GABAR1 et GABAR2. Le récepteur GABAR1 est moins sensible au fipronil que le récepteur GABAR2 (Murillo *et al.* 2011). Il a été montré que le récepteur GABAR2 d'insecte est régulé par l'activité de phosphorylation d'une protéine kinase C alors que le GABAR1 n'est pas sensible à la phosphorylation par cette enzyme. La phosphorylation du GABAR2 par la PKC entraine un blocage du récepteur. Une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ conduira à l'activation d'une CamKII qui va alors inhiber l'action de la PKC. L'inhibition de la PKC empêchera alors le blocage du GABAR2. Enfin, il a été montré que l'inhibition de la PKC au moyen d'un inhibiteur, le Gö6983 (100nM), entraine une diminution de la sensibilité du GABAR2 au fipronil d'environ 10 fois (Murillo *et al.* 2011).

Outre les récepteurs ionotropes, la modulation de la sensibilité aux insecticides selon l'état de phosphorylation concerne d'autres types de protéines comme les AChE. Le propoxur, un insecticide de la classe des carbamates, cible le site catalytique de l'acétylcholinestérase et bloque son activité. Dans les neurones d'insectes, les acétylcholinestérases peuvent être exprimées sous forme de monomère soluble ou sous forme de dimères attachés à la membrane par une ancre glycophosphatidylinositol (GPI) (Kim *et al.* 2014). Cette ancre peut être déphosphorylée par une phospholipase C spécifique des phosphatidylinositol (PI-PLC). Dans les neurones DUM de la blatte *P. americana*, il a été montré que l'activité de cette PI-PLC est régulée par un complexe calcium/CaM. Lorsque la concentration en calcium intracellulaire augmente, le complexe calcium/CaM va bloquer l'action de la PI-PLC sur l'ancre GPI ce qui entrainera une augmentation de la sensibilité de l'AChE pour le propoxur (Abd-Ella *et al.* 2015).

L'ensemble de ces données montre que les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation dépendants du calcium peuvent moduler la sensibilité des cibles moléculaires à différentes classes d'insecticides (Figure 5).

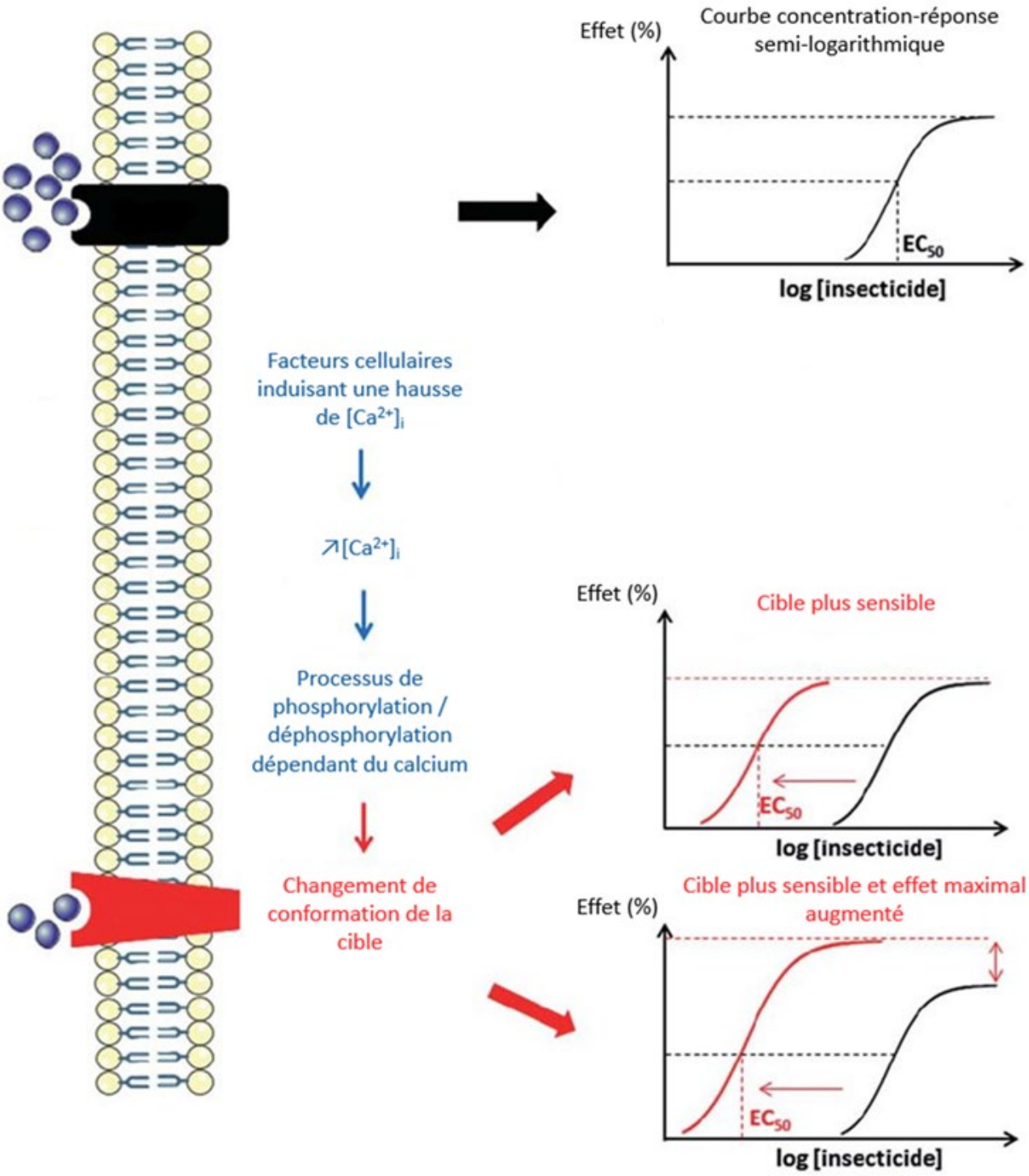

Figure 5 : Effets hypothétiques des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation dépendants du calcium sur l'augmentation de la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides.
Modifiée d'après Apaire-Marchais *et al*. 2016.

3. Le calcium, un acteur clé dans la mise en place de nouvelles stratégies dans la lutte antivectorielle

Le calcium est un second messager impliqué dans la régulation de nombreux aspects de la vie des cellules, comme la prolifération, la différenciation ou la mort cellulaire. Dans le système nerveux plus particulièrement, les influx de calcium sont impliqués dans le déclenchement de l'exocytose des neurotransmetteurs ou bien dans l'induction de la plasticité synaptique (Grienberger et Konnerth 2012). La régulation de la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides par les mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation est induite par l'activation des voies de signalisation ayant pour première étape l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Raymond *et al.* 2017). L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ peut être détectée par de multiples protéines effectrices, telles que la PKA, la PKC, la calmoduline et la CaM kinase II. Ainsi, dans le but d'optimiser l'efficacité des insecticides tout en contournant les résistances, le développement de nouvelles stratégies basées sur l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est envisageable. Ces stratégies reposeront sur l'association d'un insecticide et d'un agent synergisant permettant d'augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ (Apaire-Marchais *et al.* 2016).

3.1. Utilisation de virus d'insectes comme agent synergisant

La modulation de la concentration en calcium intracellulaire joue un rôle majeur dans l'infection virale. En modulant la $[Ca^{2+}]_i$, les virus régulent les voies de signalisation jouant un rôle dans leur cycle de réplication. De nombreuses protéines virales agissent sur divers effecteurs afin d'augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ lors de l'infection (Zhou *et al.* 2009). En effet, le calcium est impliqué dans de très nombreux processus cellulaires pouvant être bénéfiques pour maintenir l'infection ou la production de virions. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ peut : (i) accélérer certains processus cytosoliques comme l'activation de facteurs de transcription pour permettre d'augmenter la production de virions, (ii) augmenter la production d'adénosine triphosphate (ATP) par la mitochondrie afin de fournir l'énergie nécessaire à la réplication virale, (iii) diminuer l'activité du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi pour permettre de diminuer la réponse immunitaire de l'hôte et prolonger l'infection, (iv) favoriser l'accumulation de vésicules du RE et de l'appareil de Golgi permettant la mise en place d'un microenvironnement favorable à la réplication des virus à ARN, (v) contrôler la réponse apoptotique afin d'une part, d'éviter son activation au début de l'infection (en tant que mécanisme de défense) et d'autre part, de la déclencher afin d'entrainer l'éclatement de la cellule et l'expulsion des virions (Zhou *et al.* 2009).

Parmi les familles de virus pouvant infecter les insectes, deux d'entre elles, les baculovirus et les densovirus, sont envisagées comme agent de biocontrôle du fait de deux de leurs caractéristiques. En effet, ces deux familles présentent l'avantage d'être sûre d'utilisation pour les humains, mais aussi pour l'environnement puisqu'elles ne peuvent se répliquer que dans des cellules d'arthropodes. De plus, chaque souche présente une spécificité d'infection le plus souvent limitée à une espèce (Carlson *et al.* 2006; Szewczyk *et al.* 2006).

Étant donné leur faculté à augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ lors de l'infection, l'utilisation de ces virus comme agent synergisant dans de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes vecteurs de maladie est envisageable (Figure 6). Par exemple, il a été montré que l'infection de cellules d'insecte provenant de la lignée cellulaire *Sf*9 par le baculovirus *Autographa californica* multiple nucléopolyhedrovirus (*Ac*MNPV) entrainait une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ de ces cellules. Dans des cellules *Sf*9 exprimant l'AChE1 d'*An. gambiae*, la hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par

ces virus entraine une augmentation de la sensibilité de l'AChE1 à un organophosphoré, le chlorpyriphos-éthyl (Licznar *et al.* 2014).

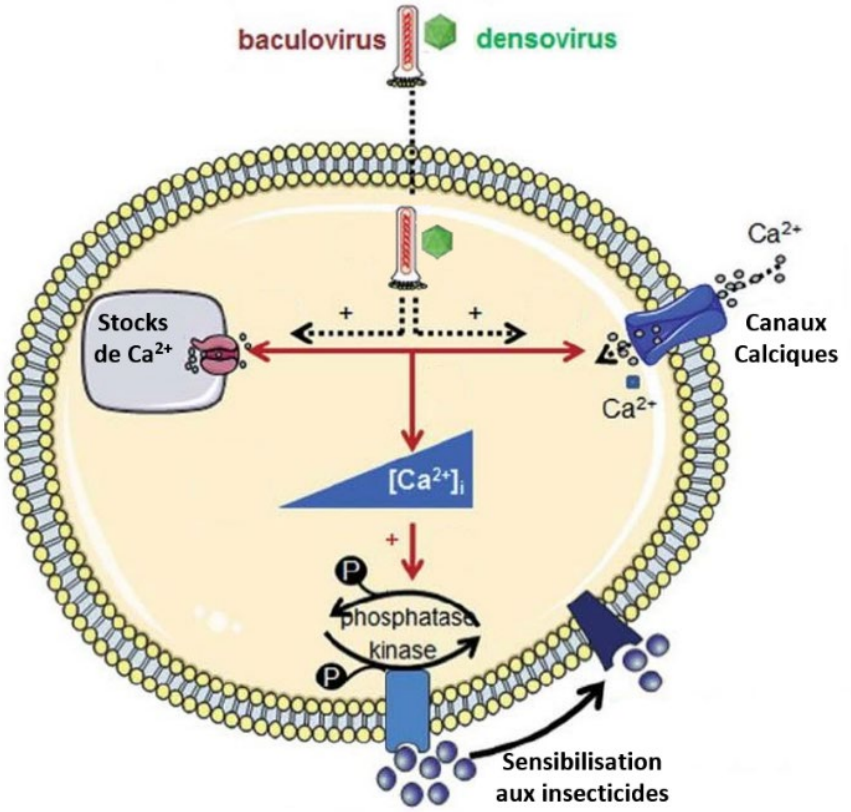

Figure 6 : Schéma représentant la stratégie d'utilisation de virus comme agent synergisant à un insecticide. Modifiée d'après Apaire-Marchais *et al*. 2016.

3.2. Utilisation de produits phytosanitaires comme agents synergisants

Les agents synergisants peuvent aussi être d'origine chimique. Il peut s'agir d'insecticides ou de répulsifs d'insectes utilisés à des doses non toxiques afin de potentialiser l'effet d'un autre insecticide. Ces composés devront interagir avec des récepteurs ou des canaux à la membrane cellulaire et entrainer de façon directe ou indirecte une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Par exemple, il a été montré sur les neurones DUM de *P. americana*, que la deltaméthrine peut augmenter la concentration en calcium intracellulaire. La deltaméthrine est un insecticide de la classe des pyréthrinoïde de type II agissant sur les canaux Na_v. Étant donné son mode d'action, elle entraine une ouverture prolongée des canaux Na_v conduisant à une entrée de sodium importante dans la cellule. L'augmentation de la concentration en sodium intracellulaire conduit la cellule à inverser l'action de l'échangeur sodium/calcium. En fonctionnement normal, cet échangeur membranaire assure une sortie d'ion calcium de la cellule contre l'entrée d'ions sodium dans la cellule. Ainsi, en mode inverse, l'échangeur fera sortir du sodium et entrer du calcium. Ce mode d'action de la deltaméthrine permet d'augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ (Pitti Caballero *et al.* 2019). Cette hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ permet d'augmenter la sensibilité des canaux Na_v au DCJW, le métabolite actif de l'indoxacarbe (Lavialle-Defaix *et al.* 2010; Pitti Caballero *et al.* 2019).

Certaines études ont montré que le DEET, un répulsif, peut induire un effet neuro-excitateur sur le système nerveux central de certains insectes en agissant sur les récepteurs octopaminergiques (Swale *et al.* 2014). Ces composés à effet répulsif ont donc été envisagés comme des agents synergisants des insecticides. En effet, il a été montré sur les neurones DUM de *P. americana* que le DEET à faible concentration (10^{-8}M) pouvait, *via* l'activation de récepteurs muscariniques (mAChRs), provoquer une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Cette augmentation entrainerait la sensibilisation de l'AChE à un carbamate : le propoxur (Abd-Ella *et al.* 2015). De plus, une étude récente, réalisée sur les neurones DUM de *P. americana*, a montré qu'un autre répulsif, l'IR3535, utilisé à faible concentration (10^{-8}M), pouvait augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ *via* sa fixation sur un récepteur muscarinique. Cette hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par la fixation de l'IR3535 potentialise l'effet d'un néonicotinoïde, le thiaclopride, sur les nAChRs (Moreau *et al.* 2020).

Ces exemples montrent que certains insecticides ou répulsifs peuvent être utilisés comme agent synergisant. Il est intéressant de noter que le DEET et l'IR3535 ciblent tous les deux des récepteurs muscariniques. Les récepteurs muscariniques comme de nombreux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont des cibles peu exploitées dans la lutte contre les insectes nuisibles (Swale 2019). Des stratégies ciblant ces récepteurs afin de potentialiser l'effet des insecticides par la hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ doivent donc faire l'objet d'études plus approfondies.

Chapitre 3 : Récepteurs muscariniques : des récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G

1. Récepteurs muscariniques de mammifères

1.1. Structure moléculaire

1.1.1. Structure des récepteurs muscariniques

Les mAChRs sont très bien caractérisés chez les mammifères étant donné l'intérêt qu'ils présentent en tant que cible thérapeutique. Ils constituent une famille de récepteurs formée de 5 sous-types numérotés de M1 à M5 encodés par 5 gènes différents nommés *CHRM1*-*CHRM*5 (Eglen 2005).

Les récepteurs muscariniques font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et plus particulièrement de la classe A dont font partie les RCPG structurellement similaires à la rhodopsine (Hulme *et al.* 2003). Les RCPG de la classe A sont constitués d'un domaine central formé de 7 segments transmembranaires (TM) numérotés de TM1 à TM7. Ces TMs sont formés d'hélices α reliées par 3 boucles extracellulaires (e1, e2 et e3) et 3 boucles intracellulaires (i1, i2 et i3) variant dans leur séquence et leur taille selon le sous-type de mAChRs. Une des caractéristiques des RCPGs de la classe A est la présence d'un pont disulfure entre les boucles e1 et e2 reliant deux cystéines hautement conservées (C-C). L'extrémité N-terminale est extracellulaire et l'extrémité C-terminale intracellulaire. L'extrémité C-terminale comporte une huitième hélice α (hélice 8) formant un angle droit avec le TM7 et qui se place sous la membrane cellulaire (Figure 7) (Bockaert et Pin 1999; Hulme *et al.* 2003).

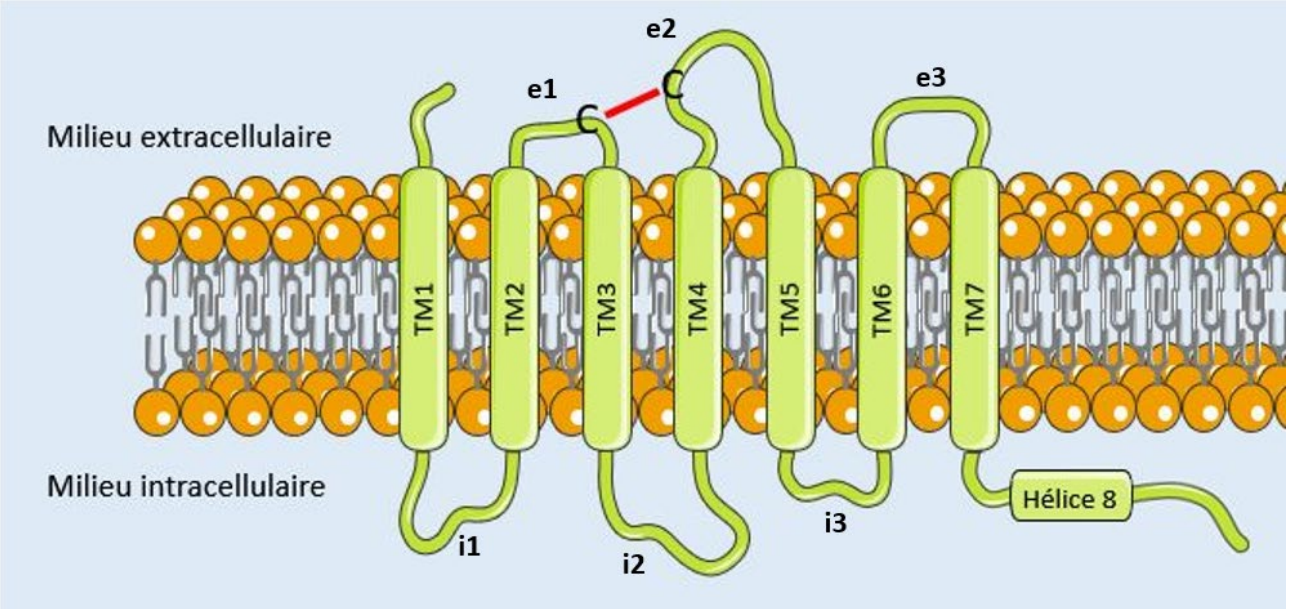

Figure 7 : Schéma de la structure d'un récepteur muscarinique.

Avant les années 2010, la structure des mAChRs était modélisée à partir de celle de la rhodopsine (Hulme *et al.* 2003). Puis, l'obtention de la structure cristalline des récepteurs de sous-type M1, M2, M4 et M5 humain et du récepteur de sous-type M3 de rat en haute résolution a permis de définir la structure tridimensionnelle de ces récepteurs (Haga *et al.* 2012; Kruse *et al.* 2012; Thal *et al.* 2016; Maeda *et al.* 2019; Vuckovic *et al.* 2019).

L'analyse de ces structures cristallographiques a permis de déterminer des structures caractéristiques communes aux 5 sous-types de mAChRs. Les 7 domaines transmembranaires sont agencés en ellipse. Au centre des segments transmembranaires se trouve un canal aqueux au sein duquel se situe le site orthostérique surmonté d'un vestibule (Haga *et al.* 2012; Kruse *et al.* 2012; Thal *et al.* 2016; Vuckovic *et al.* 2019). Dans la structure cristalline du récepteur de sous-type M2, le canal aqueux présente une profondeur de 33Å. Ce canal s'étend au-delà du site de fixation du ligand et est interrompu au cœur de la membrane par 3 résidus leucine (Leu65 du TM2, Leu114 du TM4 et Leu392 du TM6) formant une couche hydrophobe. Ces résidus sont conservés chez les 5 sous-types de mAChRs ce qui suggère que cette couche hydrophobe est présente chez tous les mAChRs (Haga *et al.* 2012).

Les structures cristallines des différents mAChRs ont toutes été résolues à partir de récepteurs purifiés avec un antagoniste fixé au sein du site orthostérique afin de stabiliser le récepteur dans une conformation donnée. Le quinuclidinyl benzilate (QNB) a été utilisé pour stabiliser le récepteur de sous-type M2. Pour les autres sous-types, le tiotropium a été employé. Les résidus impliqués dans la fixation du QNB au sein du site orthostérique du récepteur de sous-type M2 sont aussi conservés chez les autres sous-types ce qui est cohérent avec le fait que le QNB soit un antagoniste non sélectif d'un sous-type de mAChRs (Haga *et al.* 2012). Les résidus de fixation du tiotropium sont conservés au sein des sous-types M1, M3, M4 et M5 (Kruse *et al.* 2012; Thal *et al.* 2016; Vuckovic *et al.* 2019). Ces données montrent une forte conservation des résidus formant le site orthostérique qui se trouve au cœur des segments transmembranaires. Cela est cohérent avec le fort pourcentage d'homologie des TMs entre les différents sous-types de récepteurs variant de 82 à 92% (Maeda *et al.* 2019).

À partir de la structure du récepteur de sous-type M2, le site de fixation de l'ACh a été déterminé par modélisation. Dans le récepteur de sous-type M2 humain, le groupement choline de l'ACh prend place, en interagissant avec l'Asp103, dans une cage aromatique formée par les Trp400, Tyr104, Tyr403 et Tyr426, alors que le groupement carbonyle interagit avec l'Asn404. Il a également été rapporté que dans d'autres protéines présentant un site de fixation à l'ACh, comme l'AChE, une cage aromatique est aussi impliquée dans l'interaction avec le groupement choline de l'ACh (Colletier *et al.* 2006; Haga *et al.* 2012).

Afin de mieux appréhender les changements structuraux ayant lieu lors de l'activation du récepteur, des analyses structurales des récepteurs de sous-types M1 et M2 réalisées avec un agoniste, l'iperoxo, ont mis en évidence plusieurs modifications structurelles. Cet agoniste a été choisi plutôt que l'ACh en raison de sa plus haute affinité pour les mAChRs, mais surtout pour sa moins grande sensibilité à l'hydrolyse. Une des caractéristiques clés de l'activation des RCPGs, et donc des mAChRs, consiste en un déplacement vers l'extérieur du canal de la portion inférieure du TM6 ainsi qu'une rotation de celui-ci. Chez les récepteurs de sous-types M1 et M2, ce mouvement s'accompagnera d'une rotation du TM5, le rapprochant alors du TM6 (Figure 8). Ces changements structuraux vont permettre la formation d'une cavité dans la partie cytosolique du récepteur permettant à l'extrémité C-terminale de la protéine G de s'engager dans le cœur du récepteur. Au niveau de la partie extracellulaire, le mouvement du TM5, du TM6 et de la boucle e2 conduit à une contraction du vestibule du récepteur (Kruse *et al.* 2013; Maeda *et al.* 2019).

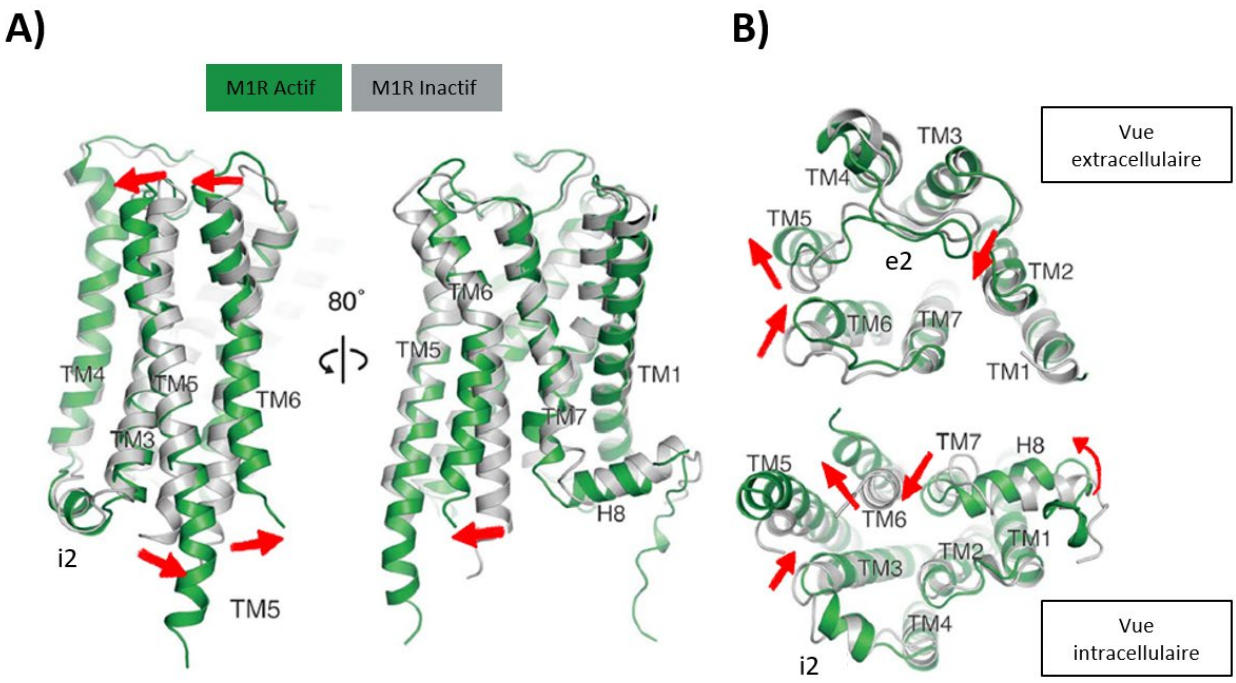

Figure 8 : Schéma comparant la position des segments transmembranaires entre les formes actives et inactives du récepteur muscarinique de sous-type M1 humain sur (A) une vue de côté, (B) une vue de la partie extracellulaire et une vue de la partie intracellulaire.
Modifié d'après Maeda *et al*. 2019

Dans la forme active du récepteur de sous-type M2, le mouvement de la portion supérieure du TM6 vers l'intérieur du canal aqueux permet le rapprochement de la Tyr403 vers les Tyr104 et Tyr426. Les liaisons hydrogènes formées par ces résidus formeront un « couvercle de tyrosine » au-dessus du site de fixation de l'agoniste (Kruse *et al.* 2013). De plus, le remplacement par mutagenèse dirigée des Tyr104 et Tyr403 du récepteur de sous-type M2 ou de la Tyr506 du récepteur de sous-type M3 (homologue à la Tyr403 du récepteur de sous-type M2) par d'autres acides aminés entraine une forte baisse de l'affinité du mAChR pour divers agonistes dont l'ACh (Wess *et al.* 1992; Vogel *et al.* 1997; Gregory *et al.* 2010). Cela indique que ces résidus tyrosines jouent un rôle majeur dans l'affinité du site orthostérique pour les agonistes.

Outre le site orthostérique, dans la partie extracellulaire des mAChRs, un site allostérique a été mis en évidence. La fixation des modulateurs allostériques se fait au niveau du large vestibule au-dessus du site orthostérique. Ce site allostérique est formé des boucles extracellulaires ainsi que de l'extrémité extracellulaire de certains segments transmembranaires (Haga *et al.* 2012; Kruse *et al.* 2012, 2013; Thal *et al.* 2016; Vuckovic *et al.* 2019). L'étude de la conformation du récepteur de sous-type M2, en présence de l'iperoxo et d'un modulateur allostérique, le Ly2119620, a montré : i) que la conformation active du récepteur de sous-type M2 présentait une contraction de la cavité où se trouve le site allostérique liée au mouvement du TM6 ; ii) que le mouvement du TM6 entraine une modification de la structure de trois régions : le vestibule extracellulaire, le site orthostérique et la surface intracellulaire. Ainsi, lorsqu'un modulateur allostérique se fixe au niveau du vestibule, le couplage structurel du vestibule, du site orthostérique et de la surface intracellulaire *via* le mouvement du TM6 module l'affinité et l'efficacité des ligands orthostériques (Kruse *et al.* 2013).

1.1.2. Dimérisation et hétéromérisation des mAChRs

La conception initiale de la signalisation des récepteurs muscariniques postulait que le signal était transduit au travers de la membrane par un monomère de récepteur couplé à une protéine G hétérotrimérique. Aujourd'hui, de nombreuses études indiquent que les RCPG de la classe A et donc les mAChRs peuvent former des dimères (homodimères ou hétérodimères) mais aussi des oligomères plus complexes (Hern *et al.* 2010; Herrick-Davis *et al.* 2013; Patowary *et al.* 2013; Liste *et al.* 2015; Shivnaraine *et al.* 2016; Marsango *et al.* 2018).

Il reste à l'heure actuelle beaucoup de questions non résolues concernant la structure quaternaire des RCPG de la classe A. Quelle est la proportion d'une population de récepteurs présentant une structure quaternaire à la membrane ? Cette proportion est-elle affectée par le niveau d'expression des récepteurs ? Comment ces structures peuvent-elles être régulées par leur interaction avec des ligands ou d'autres composés de la cellule? Le cas des récepteurs muscariniques est un bon exemple du manque de certitudes sur le sujet (Pediani *et al.* 2016; Marsango *et al.* 2018).

Bien que la capacité des mAChRs à former des structures quaternaires soit aujourd'hui acceptée, sa constitution exacte reste à déterminer. Pour chacun des trois sous-types de mAChRs dont la structure quaternaire a été étudiée (M1, M2 et M3), le nombre de protomères par complexe ainsi que leur proportion varient d'une étude à l'autre.

La première possibilité serait que les mAChRs soient majoritairement à l'état de monomères et que seule une petite partie d'entre eux soient sous forme dimérique. Pour chacun des trois sous-types (M1-M3), il existerait un équilibre dynamique entre les formes monomériques et dimériques. Cet équilibre dynamique pourrait être déplacé vers l'une ou l'autre des formes en fonction du niveau d'expression des récepteurs ou bien de la liaison d'un ligand (Hern *et al.* 2010; Nenasheva *et al.* 2013; Pediani *et al.* 2016). Les dimères de récepteurs pourraient être d'ailleurs homomériques ou hétéromériques. En effet, des travaux de co-expression de récepteurs humains de sous-types M2 et M3, dans un système hétérologue, ont montré l'existence d'homodimères M2-M2 et M3-M3, mais aussi d'hétérodimère M2-M3 à la membrane des cellules (Aslanoglou *et al.* 2015). D'autres études suggèrent que la structure quaternaire des mAChRs oscille de façon dynamique entre une forme dimérique et tétramérique (Herrick-Davis *et al.* 2013; Patowary *et al.* 2013). Enfin, certaines études suggèrent que les mAChRs existent uniquement sous forme de tétramères agencés en « losange » (Liste *et al.* 2015; Shivnaraine *et al.* 2016).

Certaines études rapportent que le passage d'une structure quaternaire à une autre est influencé par la fixation d'un ligand aux mAChRs (Aslanoglou *et al.* 2015; Pediani *et al.* 2016) alors que d'autres n'observent pas ce phénomène (Herrick-Davis *et al.* 2013; Pediani *et al.* 2016). De plus, au sein d'une même étude, des différences peuvent apparaître entre deux sous-types de récepteurs ou en fonction des ligands employés. Par exemple, l'étude de l'équipe du Pr Milligan a montré, au moyen de deux antagonistes des sous-types M1 et M3, la pirenzépine et la télenzépine, que leur fixation augmentait le ratio dimère/monomère pour le récepteur de sous-type M1 mais pas pour le récepteur de sous-type M3 (Pediani *et al.* 2016).

Une autre hypothèse serait que le niveau d'expression à la membrane des mAChRs pourrait influencer leur oligomérisation. Pour certains, le niveau d'expression n'impacte pas la formation de complexes de plus haut ordre (Herrick-Davis *et al.* 2013) alors que d'autres études suggèrent le contraire (Hern *et al.* 2010; Nenasheva *et al.* 2013).

L'oligomérisation des mAChRs se fait par l'interaction entre les segments transmembranaires. Des travaux de mutagenèse dirigée des différents segments transmembranaires du récepteur de sous-type M3 humain, ont montré que des mutations dans les TM1, TM4, TM5, TM6, TM7 ainsi que dans l'hélice 8 intracytoplasmique affectaient l'oligomérisation du récepteur de sous-type M3. Ces données suggèrent un modèle d'assemblage en tétramère du récepteur de sous-type M3 dans lequel chaque homodimère interagirait avec l'autre *via* une interface entre les TM6 et TM7 faisant face aux TM1, TM2 et à l'hélice 8. L'interaction entre les deux protomères se ferait *via* une interface avec de part et d'autre le TM1 et l'hélice 8 (Liste *et al.* 2015). D'autres travaux prennent aussi en compte l'interaction des protéines $G\alpha_i$ hétéromériques avec le récepteur de sous-type M2 humain. Ces travaux suggèrent qu'entre les différents protomères d'un tétramère, l'interface se ferait entre les TM4 et TM5 (Shivnaraine *et al.* 2016).

Bien que la capacité des mAChRs à former des structures quaternaires ait été établie au travers de nombreuses études, la taille des complexes et les paramètres influant leur formation ou leur séparation restent en débat dans la communauté scientifique.

1.2. Transduction du signal par les mAChRs dans le système nerveux

Les mAChRs font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. La transduction du signal sera donc initiée par le couplage du récepteur avec une protéine G hétérotrimérique composée des sous-unités Gα, Gβ et Gγ. Ce complexe protéique transmet directement le signal des RCPGs aux molécules effectrices. À la suite de la fixation d'un agoniste, le récepteur entrainera le remplacement de la guanosine diphosphate (GDP) associé à la sous-unité Gα par une guanosine triphosphate (GTP). Il en résultera une dissociation de la sous-unité Gα du complexe entrainant alors deux signalisations distinctes : la première médiée par la sous-unité Gα et la seconde par le complexe Gβγ, formé par les sous-unités Gβ et Gγ. Les protéines G sont identifiées à partir de la sous-unité Gα qui les compose. Il en existe 16 différentes réparties en quatre familles nommées : $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$, et $G\alpha_{12/13}$. Chaque famille diffère les unes des autres par la voie de signalisation qu'elle active (Lanzafame *et al.*, 2003; Syrovatkina *et al.*, 2016; van Koppen et Kaiser, 2003).

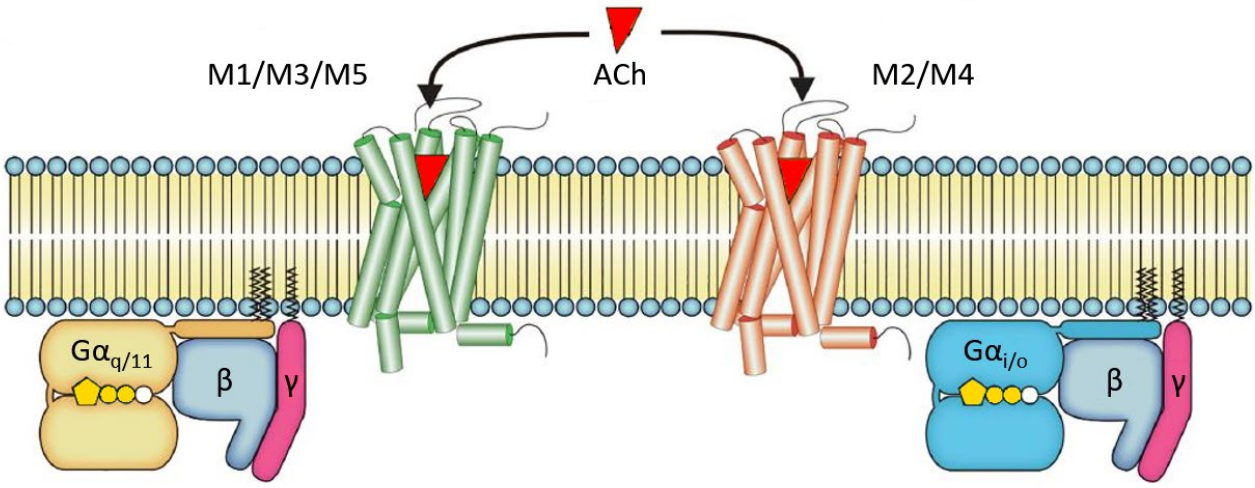

Figure 9 : Schéma représentant les sous-types de mAChRs et les complexes de protéines G hétérotrimériques associés. Modifié d'après Maeda *et al*. 2019.

Il est admis que les récepteurs muscariniques se couplent préférentiellement à deux familles de protéines G. Les récepteurs de sous-types M1, M3 et M5 sont généralement couplés aux protéines $G\alpha_{q/11}$ alors que ceux de sous-types M2 et M4 sont généralement couplés aux protéines $G\alpha_{i/o}$ (Figure 9) (Caulfield et Birdsall, 1998; Lanzafame *et al.*, 2003). Cependant, certaines études ont montré que le récepteur de sous-type M2 pouvait activer des protéines G de la famille $G\alpha_{q/11}$ mais aussi de la famille $G\alpha_s$. Ceci a été observé en cas de très fortes concentrations de récepteur à la membrane ou lors de l'inactivation des protéines $G\alpha_{i/o}$ avec de la toxine pertussique (Michal *et al.* 2001, 2007; Griffin *et al.* 2007).

Une étude récente a mis en lumière des éléments de réponse quant à la sélectivité des mAChRs pour un type de protéine Gα donné. Au moyen de modélisations se basant sur les structures cristallographiques des récepteurs de sous-types M1 et M2, ils ont montré que ces deux sous-types de récepteurs peuvent interagir avec les sous-unités $G\alpha_q$ et $G\alpha_i$. Cependant, en combinant des analyses structurales et des analyses thermodynamiques des énergies libres de liaison, ils ont mis en évidence que les couples classiquement apparentés (M1/$G\alpha_q$ et M2/$G\alpha_i$) présentaient une plus grande affinité de liaison entre le récepteur et la protéine Gα que les couples non classiquement apparentés (M1/$G\alpha_i$ et M2/$G\alpha_q$). Ainsi, la thermodynamique des interactions mAChR/Gα contribuerait à la sélectivité d'un sous-type de mAChR pour une famille de protéines Gα (Santiago et Abrol, 2019).

1.2.1. Voies de signalisation régulées par les sous-unités Gα couplées aux mAChRs

La fixation d'un agoniste sur un récepteur de sous-types M1, M3 ou M5 le fera passer dans un état conformationnel actif. L'activation de ces mAChRs entraine la dissociation de la sous-unité Gα de la protéine G hétérotrimérique. Toutes les sous-unités Gα de la famille $G\alpha_{q/11}$ activent une des quatre isoformes de phospholipase C-β (PLC-β1-4). L'activation d'une phospholipase C (PLC) entrainera le clivage d'un phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP_2) en deux composés distincts : l'inositol triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG). À la surface du réticulum endoplasmique, se trouvent les récepteurs canaux à l'IP_3 (IP_3R) perméables au calcium. L'activation de ces récepteurs par la fixation de l'IP_3 entrainera l'ouverture du canal et une libération du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique ce qui provoquera une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Le DAG, resté à la membrane, activera une protéine kinase C (PKC). L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire pourra, quant à elle, contribuer à l'activation de la PKC mais aussi activer les protéines de la famille des CaM Kinases (CaMK) (Figure 10). Ces enzymes pourront réguler de nombreux autres effecteurs et d'autres voies de signalisation par phosphorylation (Caulfield et Birdsall, 1998; Lanzafame *et al.*, 2003; Mikoshiba, 2015; Rhee et Bae, 1997; Syrovatkina *et al.*, 2016).

Lorsqu'un agoniste active un mAChR de sous-types M2 ou M4, son passage à l'état conformationnel actif lui permettra d'activer une protéine de la famille $G\alpha_{i/o}$. La sous-unité $G\alpha_{i/o}$ inhibe l'activité des adénylates cyclases (AC). Les adénylates cyclases sont des enzymes capables de convertir l'adénosine triphosphate en adénosine monophosphate cyclique (Figure 11). L'AMPc permet d'activer, entre autres, la protéine kinase A. Comme les PKC et les CaMK, les PKA peuvent réguler l'activité d'autres protéines par le mécanisme de phosphorylation. Ainsi, l'inhibition de la production d'AMPc par l'adénylate cyclase diminuera l'activité des PKA (Caulfield et Birdsall, 1998; Lanzafame *et al.*, 2003; Syrovatkina *et al.*, 2016).

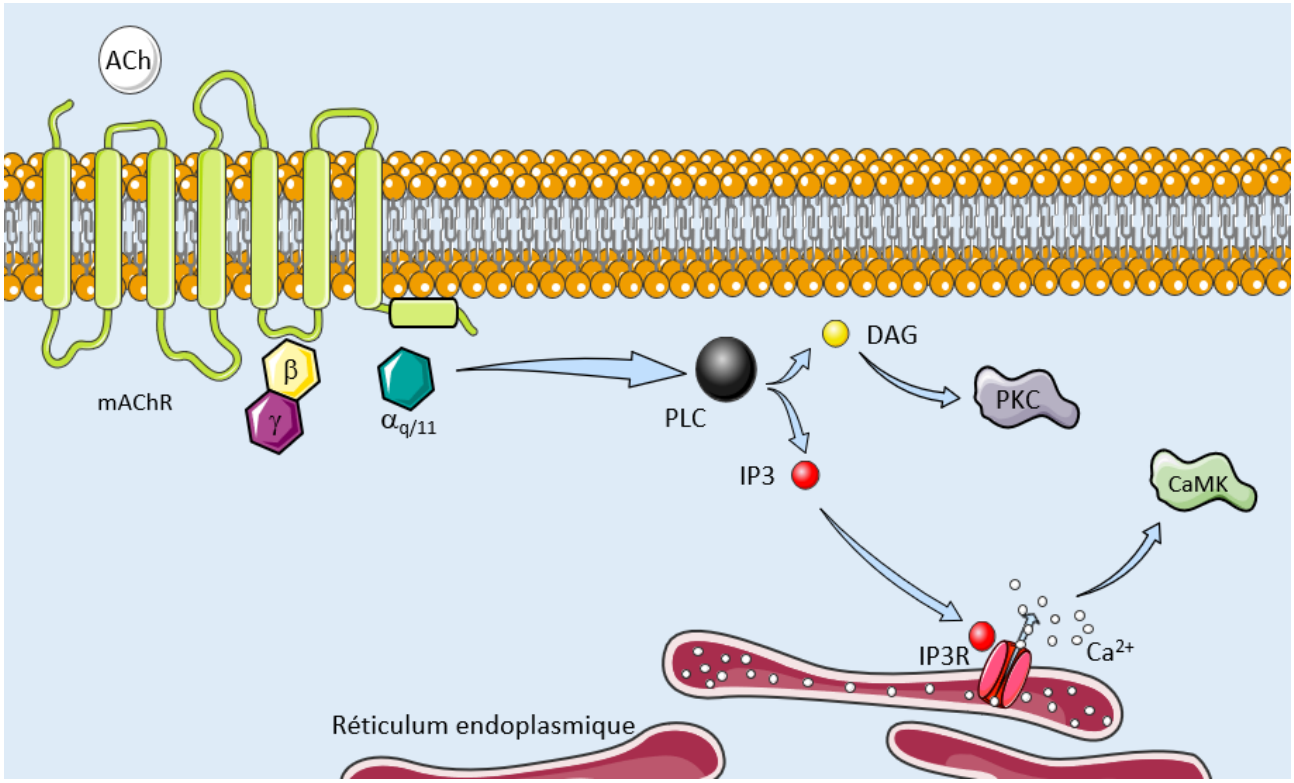

Figure 10 : Schéma de la voie de signalisation activée par les mAChRs couplés aux protéines $G\alpha_{q/11}$.

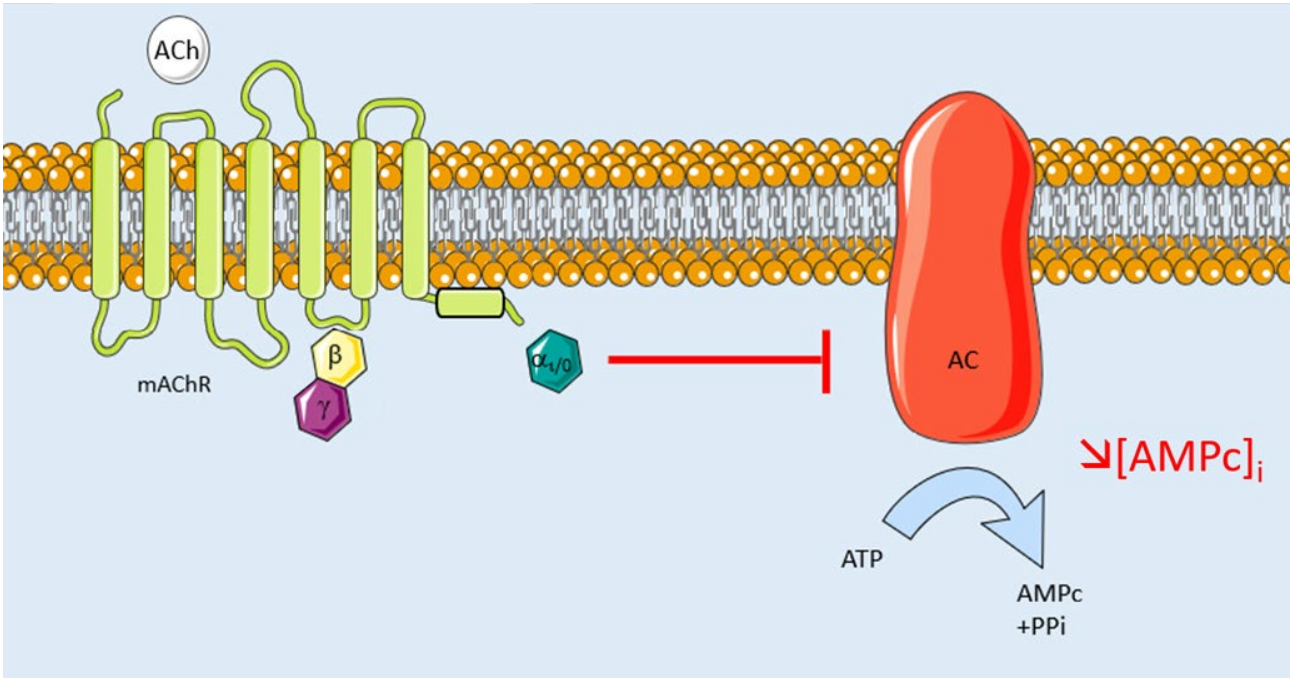

Figure 11 : Schéma de la voie de signalisation activée par les mAChRs couplés aux protéines $G\alpha_{i/o}$.

1.2.2. Voies de signalisation régulées par les dimères Gβγ couplés aux mAChRs

Lors de l'activation d'un mAChR par un agoniste, les sous-unités Gβγ jouent elles aussi un rôle dans la signalisation. Les sous-unités Gβγ ne subissent pas de modification lors de leur activation à l'inverse de la sous-unité Gα à laquelle se fixe un GTP à la place du GDP. Cela suggère que l'association des Gβγ avec une Gα-GDP bloque l'action des Gβγ qui seraient activés constitutivement (Tennakoon *et al.* 2021).

Il existe chez les mammifères 5 sous-unités Gβ (Gβ1-Gβ5) et 12 sous-unités Gγ (Gγ1-Gγ5 et Gγ7-Gγ13). Les dimères de sous-unités Gβγ agissent selon deux mécanismes en fonction de la localisation et de leur effecteur. Le premier consiste en un recrutement d'un effecteur circulant dans le cytosol, qui se fixe au dimère Gβγ pour interagir avec son substrat localisé à la membrane. Le second consiste en la modulation d'un effecteur déjà présent à la membrane plasmique (Tennakoon *et al.* 2021).

Les adénylates cyclases peuvent être régulées par les sous-unités de la famille $G\alpha_{i/o}$ qui ont un rôle inhibiteur sur ces enzymes et les sous-unités de la famille $G\alpha_s$ qui ont une action stimulatrice (Syrovatkina *et al.* 2016). Les dimères Gβγ peuvent aussi réguler l'activité des adénylates cyclases mais d'une façon différente selon l'isoforme d'adénylate cyclase. Chez les mammifères, il existe 9 AC différentes (AC1-AC9) codées chacune par un gène distinct. D'une façon générale, les Gβγ peuvent avoir une action stimulatrice sur les AC2, AC4 et AC7, et une action inhibitrice sur les AC1 et AC8. L'action stimulatrice des Gβγ sur les AC2, AC4 et AC7 ne peut se faire qu'en synergie avec une $G\alpha_s$. Il en résultera une hausse plus importante de la concentration d'AMPc intracellulaire qu'avec l'action de la $G\alpha_s$ seule (Sunahara et Taussig, 2002). Par exemple, il a été montré, chez le rat, que l'activation des récepteurs de sous-type M4 dans le bulbe olfactif pouvait activer des sous-unités Gβγ stimulant l'activité des AC2 et AC4 en synergie avec une $G\alpha_s$, activée par l'action d'autres neurotransmetteurs (Lanzafame *et al.*, 2003; Olianas *et al.*, 1998; Onali et Olianas, 1995).

Les voies de signalisation des MAP kinases (MAPK) consistent en une activation de kinases par des chaines de phosphorylation. Ainsi, une MAP kinase sera activée par une MAPK kinase. Les voies des MAP kinases sont activées classiquement lorsque des signaux de croissances extracellulaires activent des récepteurs à activité tyrosine kinase. L'activation de mAChRs par un agoniste peut aussi activer les MAPK *via* l'activité des Gβγ. Les récepteurs de sous-types M2 et M4 activent une voie des MAPK, la voie de ERK1/2, au travers de la signalisation des sous-unités Gβγ (Koch *et al.* 1994; Lopez-Ilasaca *et al.* 1997; Rosenblum *et al.* 2000; Lanzafame *et al.* 2003). D'autres voies de MAPK peuvent être activées par les mAChRs *via* les sous-unités Gβγ. Par exemple, la voie de p38 MAPK peut être activée par les récepteurs de sous-types M2 et M1 dans les cellules HEK293. Les récepteurs de sous-types M2 et M1 activeront cette voie au moyen des dimères Gβγ mais le mAChR de sous-type M1 l'activera aussi *via* la sous-unité $G\alpha_{q/11}$ (Yamauchi *et al.* 1997, 2001).

1.2.3. Régulation de canaux ioniques neuronaux par les mAChRs

Les récepteurs muscariniques jouent un rôle dans la transmission du signal nerveux d'un neurone à un autre, non seulement par l'activation de voies de signalisation, mais aussi en modulant l'activité de canaux ioniques membranaires afin d'influer sur le potentiel de la membrane. Ce couplage des mAChRs avec des canaux ioniques se fait de façon indirecte, soit par l'activation des effecteurs des voies de signalisation des sous-unités Gα, soit par l'action des sous-unités Gβγ sur le canal ionique. Ce couplage indirect aura une influence sur la cinétique d'ouverture du canal, ainsi que sur la sensibilité de la réponse cellulaire à un agoniste des mAChRs. De plus, cette régulation des canaux, non pas par les récepteurs, mais par leurs effecteurs, ne permet pas de

distinguer quel sous-type de mAChR est à l'origine de la réponse observée. On peut distinguer la modulation des canaux ioniques par les protéines G de la famille $G\alpha_{q/11}$, conduisant plutôt vers une action dépolarisant la membrane, de celle de la famille $G\alpha_{i/o}$ qui entraine plutôt une action hyperpolarisante (Brown 2018).

De nombreux canaux potassiques peuvent être modulés par l'activation des mAChRs. Les courants potassiques sortants ont une action hyperpolarisante sur la membrane cellulaire. La fermeture de certains canaux est régulée non pas par les protéines G elle-même, mais par les voies de signalisation qui y sont reliées. Les canaux TREK et TASK font partie de la famille des canaux potassiques à 2 pores : K_{2P}. Ce sont des canaux potassiques constitutivement ouverts, responsables de la conductance potassique liée au courant de fuite potassique, définissant ainsi le potentiel de membrane et les propriétés électriques basales des cellules. La fermeture de ces canaux conduit à une dépolarisation de la cellule ce qui peut permettre l'induction d'un potentiel d'action (PA) ou d'augmenter la capacité de la cellule à déclencher des PA de façon répétée (Lindner *et al.* 2011; Bista *et al.* 2015; Rivas-Ramírez *et al.* 2015; Brown 2018). Les canaux potassiques de type M (K_{V7}), codés par la famille de gène KCNQ, sont des canaux potassiques dépendants du potentiel présentant une activation lente (Brown et Passmore 2009). Ces canaux sont impliqués dans les courants potassiques de la phase d'hyperpolarisation du potentiel d'action. L'inhibition des canaux K_{V7} augmente l'excitabilité de la membrane et facilite la répétition de PA (Shah *et al.* 2008). Les TREK et les canaux potassiques de type M sont maintenus ouverts par le PIP_2 alors que les TASK sont inhibés par le DAG. Ainsi, l'activation d'un mAChR couplé à une protéine $G\alpha_{q/11}$ entraine une déplétion de PIP_2 et une production de DAG par l'activation d'une PLC. L'inhibition des TREK et des TASK conduira à une diminution du courant de fuite entrainant une dépolarisation de la membrane (Lindner *et al.* 2011; Bista *et al.* 2015; Rivas-Ramírez *et al.* 2015; Brown 2018). L'inhibition du courant M induit par la déplétion en PIP_2 conduit à une augmentation de l'excitabilité membranaire et le déclenchement de PA successifs (Delmas et Brown 2005; Winks *et al.* 2005).

L'ouverture ou la fermeture des canaux potassiques peut être directement régulée par les protéines G. Les canaux Kir3 aussi appelés canaux GIRK (G protein-gated inward rectifier K^+ current) sont des canaux dont l'ouverture est régulée par l'action de protéines G. En condition physiologique, au potentiel de repos, l'ouverture de ces canaux provoque un courant sortant potassique diminuant l'excitabilité de la membrane en l'hyperpolarisant (Kano *et al.* 2019). Ces canaux peuvent être modulés à la fois par l'activation des mAChRs couplés aux protéines $G\alpha_{i/o}$ et par ceux couplés aux protéines $G\alpha_{q/11}$. L'activation de mAChRs de sous-types M2 et M4 entraine l'ouverture de ces canaux et favorise l'hyperpolarisation de la membrane. En effet, les canaux GIRK sont activés directement par les sous-unités $G\beta\gamma$ des protéines G de la famille $G\alpha_{i/o}$. Cette sélectivité se fait par des interactions entre la sous-unité $G\alpha_{i/o}$ de la protéine G et le canal, permettant ainsi l'action de la sous-unité $G\beta\gamma$ avec cet effecteur (Glaaser et Slesinger 2015; Kano *et al.* 2019). L'activation des canaux GIRK nécessite du PIP_2 comme les canaux M ou les TREK (Logothetis *et al.* 2015). Ainsi, une activation des mAChRs de sous-types M1, M3 ou M5 va entraîner une déplétion du PIP_2 et favoriser la fermeture des canaux GIRK. L'activation des PKC contribuerait également à la fermeture des canaux GIRK en phosphorylant ces derniers, ce qui diminuerait leur sensibilité pour le PIP_2 (Sohn *et al.* 2007). Ainsi, en cas de présence au sein d'une même cellule de mAChRs couplés aux $G\alpha_{i/o}$ et aux $G\alpha_{q/11}$, la régulation du courant potassique des canaux GIRK pourra se faire par un couplage réciproque de ces deux mécanismes.

L'activation des mAChRs ne module pas seulement des canaux potassiques. Elle peut aussi moduler l'état d'ouverture de canaux calciques. Les canaux Ca_v2 sont des canaux calciques dépendants du potentiel exprimés au sein des synapses dont l'ouverture, à la suite d'une dépolarisation de la membrane, participe à la libération des neurotransmetteurs. L'inhibition de ces canaux peut se faire soit par un mécanisme dépendant du potentiel et sensible à la toxine pertussique (inhibiteur des $G\alpha_{i/o}$), ou bien par un mécanisme non dépendant du potentiel et insensible à la toxine pertussique. L'activation des mAChRs de sous-type M2/M4 est responsable du premier mécanisme. Elle permettra la libération des sous-unités $G\beta\gamma$ qui interagira de façon directe avec le canal calcique, entrainant alors sa fermeture. Ce mécanisme est dépendant du potentiel, cela signifie que la dépolarisation de la membrane favorise l'inhibition par le dimère $G\beta\gamma$ (Ikeda 1996; Delmas *et al.* 1998; Zamponi et Currie 2013). Le second mécanisme correspond à l'inhibition des canaux Ca_v2 à la suite de l'activation des mAChRs couplés aux protéines $G\alpha_q$. La nature exacte du messager impliqué dans l'inhibition de ces canaux reste sujette à controverse. Un premier modèle propose une inhibition des Ca_v2 par l'acide arachidonique produit par une phospholipase A2 dont l'activation résulte de celle d'un mAChR couplé à une protéine $G\alpha_q$ (Liu et Rittenhouse 2003; Roberts-Crowley *et al.* 2009). Un second modèle propose que l'ouverture des canaux Ca_v2 requière la présence de PIP_2 et qu'une déplétion en PIP_2 entraine leur inhibition (Gamper *et al.* 2004; Suh *et al.* 2010).

1.2.4. Désensibilisation, internalisation et recyclage des mAChRs

L'exposition prolongée à un agoniste des mAChRs, et d'une façon plus large des RCPGs, entraine une atténuation de la réponse. Cette atténuation de la réponse découle de la désensibilisation des récepteurs, de leur internalisation, mais aussi d'une diminution de leur expression (Vögler *et al.* 1998, 1999; van Koppen et Kaiser 2003; Reiner et Nathanson 2012). La première étape de désensibilisation des mAChRs et des RCPGs au sens large consiste en une phosphorylation rapide du récepteur par les protéines de la famille GRK (G protein-coupled receptor kinase) (Figure 12). Cette famille de protéines comporte 7 kinases différentes nommées GRK1-GRK7. Les GRK1 et GRK7 sont exprimées seulement dans la rétine, la GRK4 dans les testicules et le cerveau, et les GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6 sont ubiquitaires (van Koppen et Kaiser 2003). La phosphorylation des mAChRs par les GRK a été largement étudiée sur le récepteur de sous-type M2. Ce récepteur peut être phosphorylé par les GRK2 et GRK3 principalement, mais aussi par les GRK5 et GRK6 avec cependant une faible efficacité (Kameyama *et al.* 1993; Richardson *et al.* 1993; Kunapuli *et al.* 1994; Loudon et Benovic 1994). D'autres études ont montré que le récepteur de sous-type M1 peut être phosphorylé par la protéine GRK2 et le récepteur de sous-type M3 par les protéines GRK2, GRK3 et GRK6 (Luo *et al.* 2008; Yeatman *et al.* 2014; Li *et al.* 2015). La phosphorylation par la protéine GRK2 se fait sur des sites spécifiques présents dans la troisième boucle intracellulaire des récepteurs de sous-types M1, M2 et M3 (Haga *et al.* 1996; Pals-Rylaarsdam et Hosey 1997; Wu *et al.* 2000). Le recrutement des GRK2 et GRK3 se fait *via* l'interaction de leur domaine PH (Pleckstrin Homology domain) avec les sous-unités $G\beta\gamma$ (Gurevich et Gurevich, 2019).

La seconde étape de la désensibilisation consiste à fixer une protéine de la famille des arrestines sur le récepteur phosphorylé (Figure 12). Chez les mammifères, il existe 4 arrestines différentes (arrestine 1-4). Les arrestines 1 et 4 sont exprimées seulement dans la rétine alors que les arrestines 2 et 3 sont ubiquitaires (Gurevich et Gurevich 2019; Staus *et al.* 2020). L'interaction des arrestines avec les RCPGs se fait avec la partie intracellulaire du RCPG. Le point de fixation des arrestines le plus important se fait au niveau de la cavité interhélicale. En insérant une boucle au cœur des domaines transmembranaires, elles prennent la place des

protéines G et ainsi interrompent la transduction du signal (Gurevich et Gurevich 2019; Staus *et al.* 2020). Des travaux étudiant la structure du récepteur de sous-type M2 sur laquelle l'arrestine 2 est fixée ont montré également deux autres points d'interaction entre ces protéines. Le premier point de contact se fait entre le domaine N-terminal de l'arrestine qui se fixe à l'extrémité C-terminale du récepteur où se situent de nombreux résidus phosphorylés. Le second point de contact se fait entre une crevasse hydrophobe de l'arrestine 2 qui interagit avec la boucle intracellulaire 2 du récepteur (Staus *et al.* 2020). L'affinité plus importante des arrestines pour les récepteurs phosphorylés leur permet de se fixer de façon plus compétitive que les protéines G ce qui permet la désensibilisation du récepteur (Gurevich et Gurevich 2019).

La diminution de la réponse des mAChRs à la suite d'une stimulation prolongée avec un agoniste peut se faire par l'internalisation des récepteurs (Figure 12). Pour les récepteurs de sous-types M1, M2, M3 et M4, cette internalisation se fait grâce au mécanisme d'endocytose par vésicules recouvertes de clathrine (Lee *et al.* 1998; Yeatman *et al.* 2014; Ockenga et Tikkanen 2015; Lambert *et al.* 2018). Ce mécanisme requiert entre autres un adaptateur : la protéine AP2 qui participe à la nucléation des puits de clathrine en permettant l'assemblage de la clathrine autour de l'invagination de la membrane. La vésicule se forme lorsque AP2 se lie au PIP_2 de la membrane, aux arrestines et à la clathrine. La clathrine forme alors une cage induisant une invagination de la membrane sous la forme d'un puits. L'action d'une mécano-enzyme, la dynamine, permet la scission de la vésicule (Boucrot et McMahon 2011). Certaines études ont montré que les arrestines sont impliquées dans l'internalisation des mAChRs (Vögler *et al.* 1999; Nakajima et Wess 2012; Yeatman *et al.* 2014). Il a été montré que les arrestines 2 et 3 peuvent se fixer sur l'adaptateur AP2 ainsi qu'à la clathrine, ce qui facilite l'internalisation des mAChRs *via* les vésicules recouvertes de clathrine (Kim et Benovic 2002; Gurevich et Gurevich 2019). Ainsi, la fixation des arrestines aux mAChRs lors de la désensibilisation permettrait leur internalisation par endocytose. Cependant, leur rôle exact reste à définir. Une étude a montré que le récepteur de sous-type M4 pourrait être internalisé non pas par un mécanisme dépendant de la clathrine, mais plutôt par une endocytose dépendante de l'endophiline (Boucrot *et al.* 2015). À l'heure actuelle, aucune étude n'a montré quel mécanisme régissait l'endocytose du mAChR de sous-type M5 (Zenko et Hislop 2018). La cinétique d'internalisation diffère selon les mAChRs. Le récepteur de sous-type M2 est internalisé plus rapidement que les autres sous-types de récepteurs. Les récepteurs de sous-type M1 et M3 sont internalisés à la même vitesse, comme les mAChRs de sous-type M4 et M5. Cependant, les récepteurs de sous-type M1 et M3 sont plus rapidement internalisés que ceux de sous-type M4 et M5 (Thangaraju et Sawyer 2011).

À la suite de l'internalisation, les mAChRs peuvent être soit recyclés, soit envoyés vers le protéasome pour être dégradés. Il s'agit respectivement de la resensibilisation et de la « down-regulation » (Figure 12) (Zenko et Hislop 2018).

Le recyclage des mAChRs a été étudié notamment dans les cellules CHO. Les travaux de Thangaraju et Sawyer ont montré que les sous-types M1, M3, M4 et M5 peuvent être recyclés, mais que la majorité des récepteurs de sous-type M2 ne sont pas recyclés. L'ensemble des récepteurs de sous-type M2, M3, M4 et M5 est dégradé de façon similaire. Le récepteur de sous-type M1 présente, lui, un taux de dégradation plus important que les autres mAChRs (Thangaraju et Sawyer 2011). Seul le recyclage du récepteur de sous-type M5 a été étudié de façon plus approfondie à ce jour. Le complexe AP-3 coordonne le recrutement et le transport de récepteurs, dont les RCPGs, à travers les voies de l'endosome, en se fixant aux vésicules ainsi qu'aux protéines de transport. Deux formes de AP-3 existent, AP-3a qui dirige le trafic cellulaire vers les lysosomes et AP-3b qui

dirige le trafic vésiculaire vers la membrane. Le recrutement de ces complexes à la membrane se fait *via* les protéines de la famille AGAP (Arf GTPase activating proteins). Il a été montré que le récepteur de sous-type M5 peut interagir avec AGAP1, qui fera l'intermédiaire avec AP-3b. Ce mécanisme permettrait de réguler le recyclage des mAChRs de sous-type M5 (Bendor *et al.* 2010; Zenko et Hislop 2018).

Si la stimulation se prolonge trop, les mAChRs seront dégradés à la suite de leur internalisation et cela entrainera une diminution plus durable du nombre de récepteurs à la membrane. Tous les sous-types de récepteurs peuvent être affectés par ce mécanisme, mais les mAChRs de sous-type M1 présentent un plus fort taux de dégradation que les autres (Thangaraju et Sawyer 2011). Le mécanisme régulant l'adressage des mAChRs vers les lysosomes afin qu'ils soient dégradés reste peu étudié. Il a été montré, cependant, que les mAChRs, et particulièrement les récepteurs de sous-type M1, peuvent interagir avec des protéines de la famille GASP (GPCR Associated Sorting Protein) ainsi que Nexin 1 qui sont des protéines impliquées dans le tri endosomal pour l'adressage vers les lysosomes (Heydorn *et al.* 2004). L'ubiquitination des protéines membranaires les dirige vers les lysosomes pour leur dégradation (Hershko et Ciechanover 1998). Bien que l'ubiquitination des mAChRs n'a que peu été étudiée, une récente étude a montré que l'ubiquitination du mAChR de sous-type M2 était requise pour sa dégradation (Zenko *et al.* 2020).

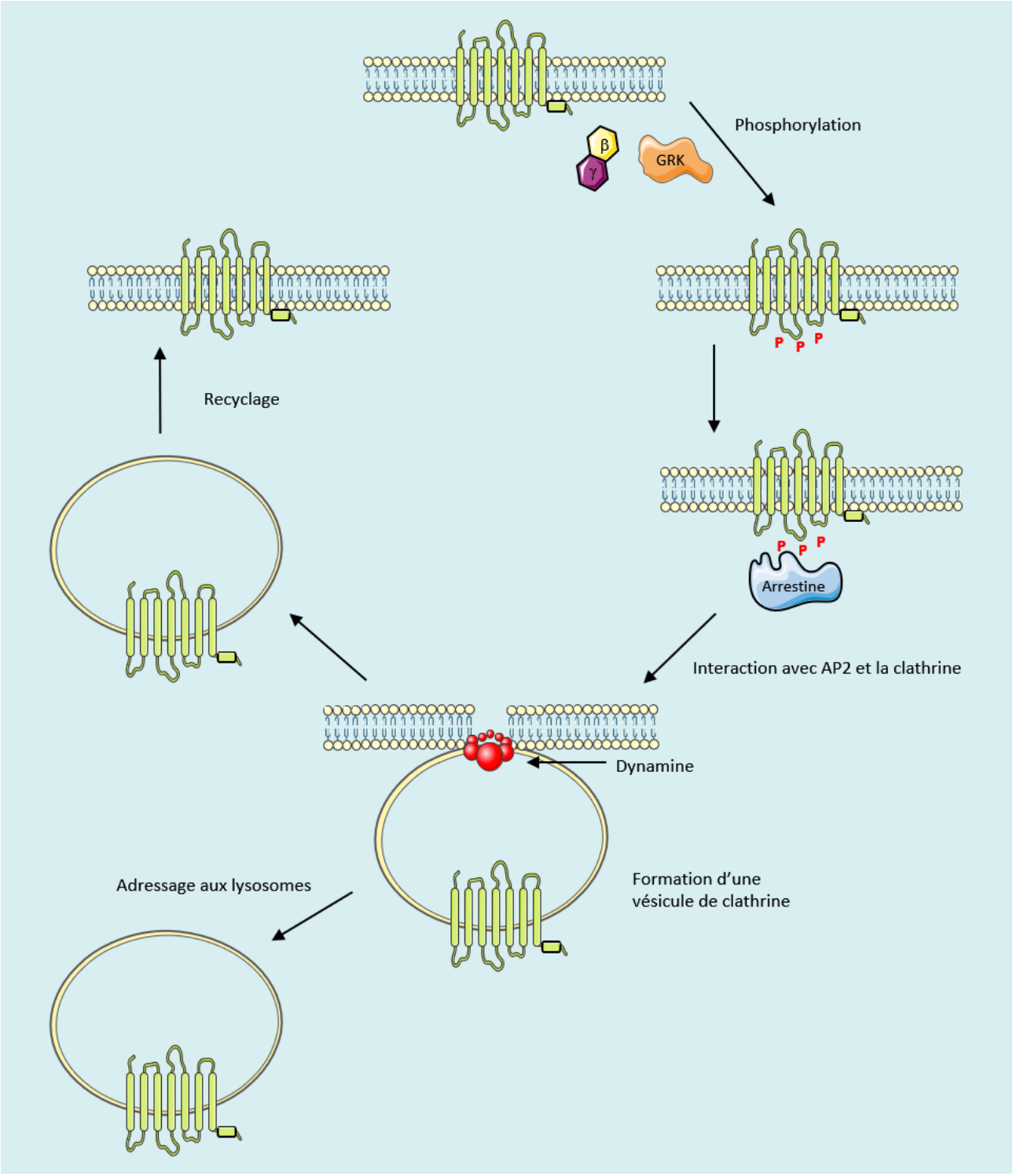

Figure 12 : Schéma récapitulatif des mécanismes régulant la désensibilisation, l'internalisation, et la « down-régulation » des mAChRs. Modifiée d'après van Koppen et Kaiser 2003.

1.3. Rôles physiologiques des récepteurs mAChRs

La réponse physiologique découlant de l'activation des différents mAChRs dépend avant tout de leur localisation ainsi que du sous-type activé. Ces récepteurs sont exprimés dans de nombreux tissus, autant dans le système nerveux central (SNC) que dans d'autres tissus périphériques. La plupart des tissus et cellules expriment au moins deux sous-types de mAChRs. Tous les sous-types de mAChRs sont exprimés dans le SNC. Dans les tissus périphériques, les mAChRs de sous-types M2 et M3 sont majoritaires par rapport aux autres (Wess *et al.* 2007). Dans le système nerveux, les mAChRs jouent un rôle dans les fonctions végétatives, sensorielles, cognitives et motrices. En périphérie, ils jouent un rôle dans la sécrétion glandulaire, la contraction des muscles lisses et le ralentissement du rythme cardiaque (Eglen 2012).

1.3.1. Fonction des mAChRs selon leur localisation synaptique

Dans le système nerveux central, contrairement au système nerveux périphérique, l'acétylcholine n'a pas une simple fonction de neurotransmetteur, elle peut aussi jouer un rôle neuromodulateur lorsqu'elle est libérée par des neurones de projection ou des interneurones (Thomsen *et al.* 2018). L'activation des mAChRs dans les neurones peut induire divers effets à court et long terme, tant au niveau postsynaptique que présynaptique. Ces effets peuvent être excitateurs ou inhibiteurs et font intervenir des effecteurs variés.

Les mAChRs postsynaptiques peuvent avoir un rôle excitateur. Par exemple, l'inhibition de l'ouverture des canaux potassiques dépendants du potentiel appelés canaux M (K_v7) peut entrainer une dépolarisation de la membrane (Brown et Adams 1980; Brown 2010). Cette augmentation de l'excitabilité postsynaptique par la fermeture des canaux M à la suite de l'activation des mAChRs couplés à $G\alpha_{q/11}$ a été observée aussi bien dans des neurones du système nerveux périphérique (SNP) que dans des neurones du système nerveux central (SNC) (Hamilton *et al.* 1997; Shen *et al.* 2005). Dans les neurones du SNC, la fermeture de canaux de type M permet, en plus de faciliter le déclenchement des PA, la génération de trains de potentiels d'action. Ce phénomène est observable, par exemple, dans les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (Shah *et al.* 2008). À l'inverse, les mAChRs peuvent aussi avoir une action inhibitrice postsynaptique. Cette inhibition postsynaptique est causée par l'activation de canaux potassiques de la famille des canaux GIRK. Ainsi, l'activation du récepteur de sous-type M2 entraine, *via* l'ouverture des canaux GIRK, un courant potassique sortant hyperpolarisant diminuant l'excitabilité neuronale (Figure 13).

Les récepteurs muscariniques au niveau synaptique ne sont pas situés qu'en position postsynaptique, mais aussi en position présynaptique. Les mAChRs présynaptiques peuvent exercer un rétrocontrôle sur la libération de l'ACh. On parle d'autorécepteurs. Selon la structure cérébrale observée, le sous-type de récepteur associé à l'inhibition de la libération d'ACh peut être différent (Figure 13). Par exemple, dans les neurones de l'hippocampe et du cortex, cette inhibition serait plutôt due à l'activation des récepteurs de sous-type M2 alors que dans les neurones du striatum, elle serait plutôt due à l'activation des récepteurs de sous-type M4 (Zhang *et al.* 2002). L'activation des autorécepteurs de sous-type M2 entraine une diminution de la libération d'ACh par l'inhibition des canaux calciques voltages dépendants de la famille Ca_v2. La libération de neurotransmetteurs requiert une augmentation de la concentration en calcium synaptique. Ainsi, la libération d'ACh par la synapse active l'autorécepteur de sous-type M2 entrainant l'inhibition des canaux Ca_v2. L'entrée de calcium dans la synapse diminue ce qui réduit la libération d'ACh. Ce mécanisme permet ainsi un rétrocontrôle sur la libération d'ACh (Allen 1999; Brown 2010). Étant donné que le récepteur de sous-type M4 peut également inhiber les

canaux Ca_V2, il est supposé que l'inhibition de la libération d'ACh par ce sous-type de récepteur se fait selon le même mécanisme (Delmas *et al.* 1998; Brown 2010).

Les récepteurs muscariniques peuvent aussi jouer un rôle dans la plasticité synaptique. Ils sont impliqués, entre autres, dans la maturation des synapses glutamatergiques et la potentialisation à long terme (Figure 13).

Dans l'hippocampe, les synapses glutamatergiques entre les axones collatéraux de Schaffer (SC) des neurones pyramidaux de la région CA3 et les neurones pyramidaux CA1 sont distinguées en deux catégories. Les synapses dites silencieuses ne transmettent le signal que lorsque la partie postsynaptique est préalablement dépolarisée. Ces synapses silencieuses expriment des récepteurs ionotropes au glutamate NMDA qui, lorsque la membrane est au potentiel de repos, sont bloqués par le Mg^{2+} extracellulaire, mais elles n'expriment pas de récepteurs de type AMPA. Les synapses fonctionnelles, elles, expriment les deux types de récepteurs ionotropes glutamatergiques, les récepteurs NMDA et les récepteurs ionotropes AMPA (Fernández de Sevilla *et al.* 2002, 2021; Fernández de Sevilla et Buño 2003; Cabezas et Buño 2006). Ainsi, dans les synapses fonctionnelles, l'activation des récepteurs AMPA permet la dépolarisation de la membrane ce qui libérera les récepteurs NMDA du Mg^{2+} et permettra leur ouverture et une plus grande transmission du signal (Di Maio *et al.* 2016). Ces synapses peuvent recevoir des afférences cholinergiques qui influent sur leur maturation et les récepteurs muscariniques jouent un rôle autant sur la partie présynaptique que la partie postsynaptique (Fernández de Sevilla *et al.* 2002, 2021). L'activation des mAChRs dans la partie présynaptique aura pour effet de diminuer la libération du glutamate dans les synapses fonctionnelles, mais pas dans les synapses silencieuses. Les synapses fonctionnelles possèdent la machinerie cellulaire requise pour induire l'inhibition de la libération de glutamate, alors que cette machinerie est absente des synapses silencieuses. Cela permet une régulation de la maturation en favorisant la libération de glutamate dans les synapses silencieuses (Fernández de Sevilla *et al.* 2002, 2021; Cabezas et Buño 2006, 2011).

Dans la partie postsynaptique de la synapse SC-CA1, la potentialisation à long terme participe d'une part à la maturation de synapses silencieuses, mais aussi au renforcement des synapses matures. L'activation de mAChRs de sous-type M1 ou M3 va entrainer la production d'IP3 et la libération de calcium des stocks intracellulaires conduisant à l'activation de la PKC ainsi que de la CaMKII. L'activation de ces enzymes permettra la mise en place de la potentialisation à long terme de la synapse par : i) une augmentation de la quantité de récepteurs AMPA à la membrane et ii) une augmentation de la transmission synaptique par les récepteurs NMDA (Fernández de Sevilla *et al.* 2008, 2021; Fernández de Sevilla et Buño 2010). Ainsi, l'activation des mAChRs contribue à la maturation des synapses silencieuses en synapses fonctionnelles, ainsi qu'au renforcement des synapses une fois celles-ci matures.

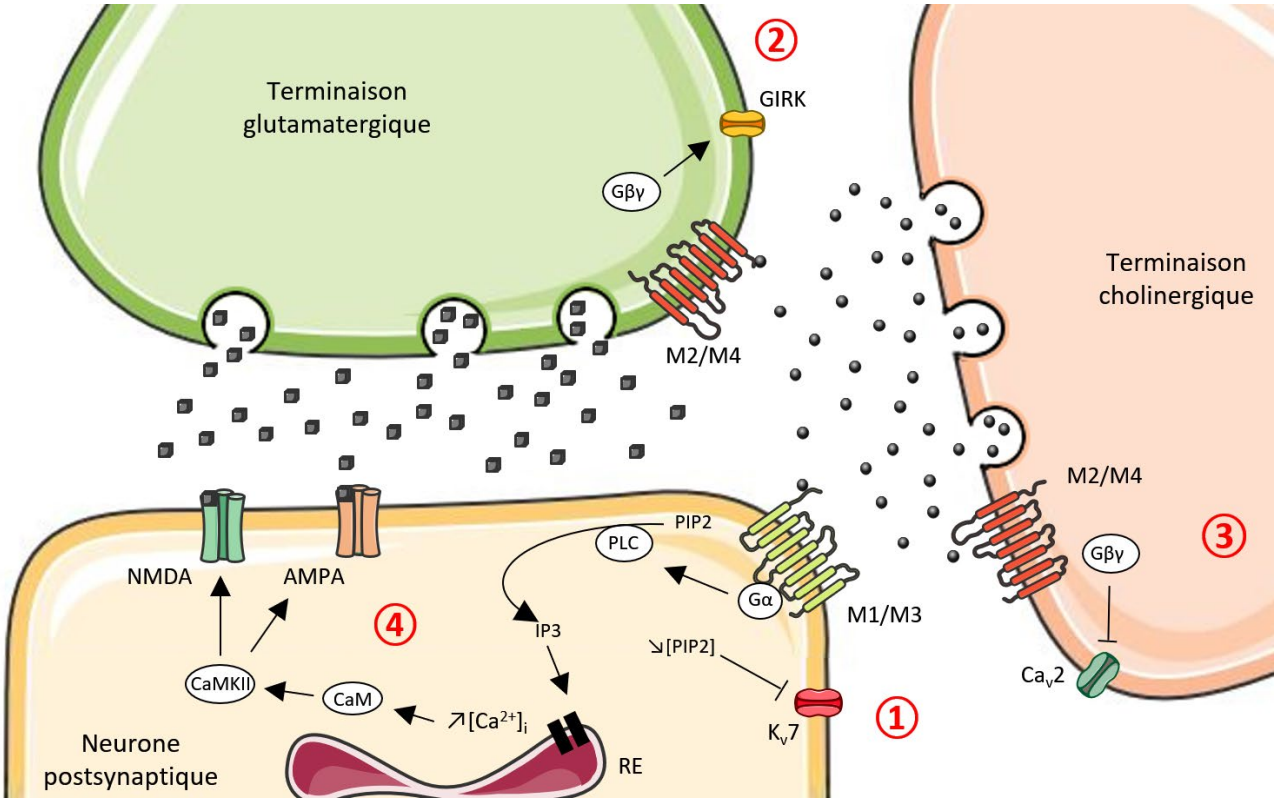

Figure 13 : Schéma récapitulatif de la fonction des mAChRs dans la synapse glutamatergique.
1) Augmentation de l'excitabilité neuronale postsynaptique par l'inactivation des Kv7.
2) Diminution de l'excitabilité neuronale postsynaptique par l'activation des canaux GIRK.
3) Rétro-inhibition de la libération d'ACh par l'inhibition des Ca_v2 par les autorécepteurs présynaptiques.
4) Augmentation de l'expression des récepteurs AMPA et de la réponse induite par les récepteurs NMDA.

1.3.2. Rôles physiologiques des mAChRs neuronaux

La mise au point de souris dites « Knock Out » (souris KO) dont l'expression d'un ou de plusieurs gènes des mAChRs a été supprimée par manipulation génétique, a permis de mettre en évidence les fonctions physiologiques dans lesquelles les sous-types de mAChRs sont impliqués.

Dans le système nerveux central, les 5 sous-types de mAChRs sont exprimés. Les rôles physiologiques que chaque sous-type de mAChRs peut jouer dans le système nerveux dépendent des structures cérébrales dans lesquelles ils sont exprimés. Dans le cortex cérébral, les récepteurs de sous-types M1, M2 et M4 sont les plus abondants. Dans l'hippocampe et dans le striatum, tous les sous-types de récepteurs sont exprimés à l'exception du sous-type M5. Le sous-type M5 n'est exprimé qu'au sein de la substance noire *pars compacta* et l'aire tegmentale ventrale. Les mAChRs de sous-type M1 et M3 sont majoritaires dans les noyaux antérodorsaux et ventraux et le récepteur de sous-type M2 dans le noyau réticulé du thalamus. L'amygdale quant à elle exprime majoritairement le récepteur de sous-type M1 (Bubser *et al.* 2012).

L'étude du sommeil chez les souris KO a permis de montrer que les mAChRs sont impliqués dans le sommeil lent et le sommeil paradoxal. L'étude des différentes phases de sommeil chez les souris n'exprimant pas les récepteurs de sous-type M2 a montré que lorsque leur sommeil n'est pas perturbé, ces souris ne présentent pas d'altération dans leur cycle de sommeil. Cependant, lorsque ces souris sont soumises à une privation de

sommeil, il a été observé un allongement de la durée du temps de sommeil paradoxal sans modification de la durée de la phase de sommeil lent profond (Turner *et al.* 2010). Chez les souris déplétées en récepteur de sous-type M3, une diminution du temps de sommeil paradoxal a été observée (Goutagny *et al.* 2005). Les mAChRs de sous-type M2 et M3 sont donc impliqués dans le contrôle des cycles de sommeil (Goutagny *et al.* 2005; Turner *et al.* 2010; Thomsen *et al.* 2018). Une étude récente a montré que les souris KO pour les mAChRs de sous-type M1 et M3 présentent une diminution de la durée du sommeil paradoxal, indiquant que ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans cette phase du sommeil (Niwa *et al.* 2018). Le rôle des récepteurs de sous-type M5 dans le sommeil n'a pas encore été exploré à l'heure actuelle.

Les récepteurs muscariniques jouent un rôle essentiel dans la régulation de la nociception. L'activation des mAChRs situés au niveau de la moelle épinière ou au niveau du cerveau entraine un fort effet analgésique (Wess *et al.* 2007; Thomsen *et al.* 2018). Chez les souris KO pour les récepteurs de sous-type M2, cet effet analgésique est diminué alors que chez les souris KO pour le récepteur de sous-type M4 aucune diminution de l'analgésie n'a été observée. Cependant, les souris KO pour les deux sous-types de récepteurs ne présentent aucune analgésie suite à l'activation des mAChRs. Ainsi, les sous-types M2 et M4 sont impliqués dans l'inhibition de la transmission de la douleur (Gomeza, Shannon, *et al.* 1999; Gomeza, Zhang, *et al.* 1999; Duttaroy *et al.* 2002; Wess *et al.* 2007; Chen *et al.* 2010, 2014).

Les récepteurs muscariniques sont aussi impliqués dans la cognition. Le récepteur muscarinique de sous-type M1 joue un rôle particulier dans ces fonctions *via* son rôle dans la plasticité synaptique (Bubser *et al.* 2012). Les souris KO pour le récepteur de sous-type M1 présentent des déficits dans les tâches impliquant la mémoire corticale ou une interaction cortex-hippocampe comme la mémoire de travail ou la mémoire sémantique. Elles ne présentent cependant pas d'altération de la mémoire dépendante de l'hippocampe comme la mémoire de référence spatiale (Anagnostaras *et al.* 2003; Bartko *et al.* 2011; Gould *et al.* 2015; Thomsen *et al.* 2018). Les récepteurs de sous-type M1 sont donc essentiels à la transmission des informations du cortex vers l'hippocampe et aux traitements de celles-ci. Les souris déplétées en récepteurs de sous-type M2 présentent des déficiences de la mémoire de travail et dans leur capacité à adapter leur comportement aux situations. Les souris KO pour les récepteurs de sous-type M2 présentent des déficits cognitifs comme dans la mémoire de travail ou la mémoire spatiale. Chez ces souris, une altération de la plasticité synaptique a également été observée dans l'hippocampe. Les récepteurs de sous-type M2 sont donc impliqués dans les fonctions cognitives (Seeger *et al.* 2004; Tzavara *et al.* 2004; Bainbridge *et al.* 2008; Bubser *et al.* 2012; Thomsen *et al.* 2018). Le rôle des mAChRs de sous-type M3 dans la cognition reste à éclaircir. Les travaux de Poulin et collaborateurs ont montré une implication du récepteur de sous-type M3 ainsi que sa phosphorylation dans le conditionnement de peur, alors que d'autres études ne semblent pas aboutir aux mêmes conclusions (Poulin *et al.* 2010; Bubser *et al.* 2012).

Le circuit neuronal de la récompense implique les corps cellulaires des neurones dopaminergiques présents dans l'aire tegmentale ventrale ainsi que leurs projections dans le noyau accumbens. La libération de dopamine dans le noyau accumbens à la suite de la prise de drogues contribue au phénomène d'addiction. Chez les souris KO pour le récepteur de sous-type M4, il a été observé une activité dopaminergique accrue dans ce noyau corrélée à un comportement addictogène accru. Par exemple, chez ces souris, l'auto-administration de cocaïne est augmentée ainsi que l'hyperactivité locomotrice en résultant (Tzavara *et al.* 2004; Schmidt *et al.* 2011). Des effets similaires d'augmentation du comportement addictogène pour l'alcool ont été rapportés chez ces souris (de la Cour *et al.* 2015). Ces résultats suggèrent une implication du récepteur de sous-type M4 dans

le circuit de la récompense et un rôle dans les comportements d'addiction. Les récepteurs muscariniques de sous-type M5 sont les seuls mAChRs détectés dans les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale. Chez les souris déplétées en récepteurs de sous-type M5, il a été montré que les perturbations du comportement liées à la cocaïne et aux opioïdes sont réduites (Basile *et al.* 2002; Fink-Jensen *et al.* 2003; Steidl et Yeomans 2009). De plus, une étude récente a montré que l'utilisation d'un modulateur allostérique négatif des récepteurs de sous-type M5 peut diminuer l'auto-administration d'alcool chez les rats ainsi que les rechutes du comportement alcoolique, ce qui conforte le rôle du sous-type M5 dans l'addiction (Berizzi *et al.* 2018).

Dans le système nerveux autonome, les mAChRs sont impliqués dans certaines fonctions comme la thermorégulation. L'activation des mAChRs avec un agoniste non sélectif, l'oxotrémorine M, entraine une diminution de la température corporelle. Cette baisse de la température est moins importante chez les souris déplétées génétiquement en récepteurs de sous-type M2 et M3 mais ne change pas chez les souris dépourvues de sous-type M1, M4 ou M5. Ainsi, les récepteurs de sous-types M2 et M3 sont impliqués dans la thermorégulation (Bymaster *et al.* 2003; Thomsen *et al.* 2018).

1.3.3. Pharmacologie des mAChRs de mammifères

La plupart des ligands actifs sur un récepteur se fixent sur le site orthostérique, se trouvant être le site de fixation du ligand endogène. D'autres sites de fixation peuvent exister outre le site orthostérique, il s'agit des sites allostériques. En se fixant au récepteur, un modulateur allostérique entraine une modification de la conformation du récepteur et induit un changement dans l'affinité du site orthostérique pour un ligand (Kruse *et al.* 2014; Bock *et al.* 2018; Jakubik et El-Fakahany 2020). Sur les mAChRs, le site orthostérique se situe au cœur des segments transmembranaires et est fortement conservé. Les sites allostériques se situent eux, au niveau des boucles extracellulaires présentant une forte variabilité (Haga *et al.* 2012; Kruse *et al.* 2012; Dror *et al.* 2013; Thal *et al.* 2016; Vuckovic *et al.* 2019).

La caractérisation pharmacologique repose sur l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes. Cependant, peu d'agonistes présentent une sélectivité pour un sous-type de mAChRs. La discrimination pharmacologique entre les sous-types repose donc sur l'utilisation d'antagonistes présentant une sélectivité plus importante pour un sous-type donné (Ishii et Kurachi 2006). Les principaux agonistes non sélectifs des mAChRs utilisés pour leur caractérisation sont l'acétylcholine, la muscarine et l'oxotrémorine M. D'autres agonistes sont également utilisés dans la littérature comme la carbamylcholine (carbachol) ou la pilocarpine. Les antagonistes non sélectifs les plus couramment utilisés pour bloquer les mAChRs sont l'atropine, la scopolamine et le QNB (3-Quinuclidinyl benzilate). Les antagonistes couramment utilisés afin de bloquer avec une plus grande affinité un sous-type donné sont : la pirenzépine pour le sous-type M1, l'AF-DX 116 pour le sous-type M2, le 4-DAMP pour le sous-type M3 et le tropicamide pour le sous-type M4 (Ishii et Kurachi 2006).

Les récepteurs muscariniques peuvent aussi être la cible de diverses toxines peptidiques. Des toxines provenant du venin du mamba vert *Dendroapsis angusticeps* et du mamba noir *Dendroapsis polylepsis*, appelées neurotoxines muscariniques (MT), ont été caractérisées pour leur capacité à inhiber la fixation de ligand sur les récepteurs muscariniques (Servent et Fruchart-Gaillard 2009; Servent *et al.* 2011). Les toxines MT1 - MT7 proviennent du mamba vert et les toxines MTα - MTγ proviennent du mamba noir (Servent et Fruchart-Gaillard 2009; Servent *et al.* 2011). Les toxines MT7 et MT3 présentent une sélectivité pour les sous-types M1 et M4 respectivement. Les autres toxines, moins sélectives, peuvent se fixer à plusieurs sous-types. Par exemple, les

toxines MT1, MT2 et MT4 peuvent se fixer avec la même affinité sur les récepteurs de sous-types M1 et M4 et avec une plus faible affinité sur les récepteurs de sous-types M2, M3 et M5. Certaines études ont montré que la toxine MT1 pourrait agir comme un agoniste sur le récepteur de sous-type M1 et que la toxine MT2 serait un agoniste des récepteurs de sous-types M1, M3 et M5. À l'inverse, les toxines MT3 et MT7 ne présentent qu'une action antagoniste (Harvey *et al.* 2002; Bradley *et al.* 2003; Servent et Fruchart-Gaillard 2009; Servent *et al.* 2011). Les propriétés de ces toxines, et particulièrement MT3 et MT7, en font des outils pharmacologiques intéressants dans l'étude des mAChRs chez les vertébrés.

Sous-types de mAChR	Agonistes (pKi)	Antagonistes (pKi)	Antagonistes sélectifs (pKi)	Système d'expression / Lignée cellulaire	Références
Sous-type M1	Acétylcholine (4,32 ± 0,07), Carbachol (4,46 ± 0,11), Oxotrémorine M (5,09 ± 0,13), Pilocarpine (5,14 ± 0,11)	Atropine (9,34 ± 0,04), Scopolamine (8,95 ± 0,31)	Pirenzépine (8,29 ± 0,12)	CHO	Jakubík *et al.* 1997; Huang *et al.* 2001
Sous-type M2	Acétylcholine (4,33 ± 0,09), Carbachol (4,19 ± 0,08), Oxotrémorine M (4,92 ± 0,09), Pilocarpine (4,92 ± 0,04)	Atropine (8,95 ± 0,02), Scopolamine (8,68 ± 0,08)	AF-DX 116 (6,29 ± 0,03)	CHO, 1321 N1	Kunysz *et al.* 1989; Jakubík *et al.* 1997; Huang *et al.* 2001
Sous-type M3	Acétylcholine (4,54 ± 0,08), Carbachol (4,42 ± 0,06), Oxotrémorine M (5,14 ± 0,01), Pilocarpine (5,09 ± 0,01)	Atropine (9,15 ± 0,11), Scopolamine (9,41 ± 0,07)	4-DAMP (9,28 ± 0,02)	CHO	Dörje *et al.* 1991; Jakubík *et al.* 1997; Huang *et al.* 2001
Sous-type M4	Acétylcholine (4,49 ± 0,08), Carbachol (4,29 ± 0,09), Oxotrémorine M (5,19 ± 0,15), Pilocarpine (5,22 ± 0,19)	Atropine (8,94 ± 0.13), Scopolamine (9,47 ± 0,06)	Tropicamide (6,86 ± 0,12)	CHO, HEK293	Jakubík *et al.* 1997; Huang *et al.* 2001; Croy *et al.* 2016
Sous-type M5	Acétylcholine (4,64 ± 0,07), Carbachol (4,32 ± 0,06), Oxotrémorine M (4,86 ± 0,06), Pilocarpine (4,83 ± 0,05)	Atropine (8,29 ± 0,17), Scopolamine (8,7)	ML-381 (6,47 ± 0,03)	CHO	Bolden *et al.* 1992; Gentry *et al.* 2014; Berizzi *et al.* 2016; Croy *et al.* 2016

Tableau 1 : Pharmacologie des récepteurs muscariniques humains présents dans les astrocytes de la lignée cellulaire 1321 N1 et exprimés en système hétérologue (lignées cellulaires CHO ou HEK293). pKi = -log(Ki)

Face à la difficulté de cibler les sous-types de mAChRs de façon sélective, l'utilisation des modulateurs allostériques semble être une approche prometteuse dans divers domaines comme la pharmacologie clinique. En effet, à l'inverse du site orthostérique qui est très conservé, les sites allostériques sont situés principalement dans les boucles extracellulaires qui sont des régions peu conservées entre les mAChRs (Dror *et al.* 2013; Bock *et al.* 2018; Jakubik et El-Fakahany 2020). On peut classer les modulateurs allostériques en trois catégories : les modulateurs allostériques positifs (PAM), les modulateurs allostériques négatifs (NAM) et les ligands allostériques neutres (NAL). Les PAM augmentent l'affinité du site orthostérique pour un ligand et les NAM la diminuent. Les NAL eux regroupent les composés se fixant sur le site allostérique induisant un changement de conformation du récepteur, mais ne modifiant pas l'affinité du site orthostérique pour le ligand. Certains modulateurs allostériques peuvent avoir une activité agoniste intrinsèque, on parlera d'agoniste allostérique (Kruse *et al.* 2014; Bock *et al.* 2018). Les modulateurs allostériques présentent quatre caractéristiques majeures (Kruse *et al.* 2014; Bock *et al.* 2018). L'effet des modulateurs allostériques est saturable, leur activité n'augmente pas au-delà d'une certaine limite, et ce même si la concentration en modulateur est augmentée. L'effet des modulateurs allostériques est dépendant du ligand se fixant sur le site orthostérique. Par exemple, le LY2033298 agit sur le récepteur de sous-type M2 comme un PAM pour l'oxotrémorine M, mais comme un NAM pour la xanoméline (Valant *et al.* 2012). Ces modulateurs allostériques peuvent entrainer un agonisme biaisé. Cela signifie qu'en cas de fixation du modulateur allostérique, le ligand orthostérique entrainera une signalisation différente ou incomplète. Par exemple, le PAM VU029767 potentialise l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'activation du récepteur de sous-type M1 en réponse à l'ACh. Cependant, l'activation de la phospholipase D en réponse à l'ACh est plus faible lorsque le PAM est fixé sur le récepteur de sous-type M1 qu'en son absence (Marlo *et al.* 2009). Enfin, un modulateur allostérique peut présenter une sélectivité pour un récepteur donné. Cette sélectivité peut se faire par deux mécanismes : une faible conservation des séquences des sites allostériques d'un mAChR à un autre ou bien une coopérativité sélective différente entre le site allostérique et le site orthostérique pour un récepteur donné (Kruse *et al.* 2014; Bock *et al.* 2018). Par exemple, le thiochrome présente une activité allostérique sélective par coopérativité pour le récepteur de sous-type M4. En effet, le thiochrome à une affinité similaire pour tous les mAChRs sauf pour le sous-type M5, mais il n'augmente l'affinité du récepteur pour l'ACh que pour le sous-type M4 (Lazareno *et al.* 2004).

2. mAChRs d'insectes, des récepteurs méconnus

L'acétylcholine est un neurotransmetteur majeur chez les insectes (Pitman 1971; Gerschenfeld 1973). Comme chez les vertébrés, des récepteurs nicotiniques (nAChRs) et muscariniques (mAChRs) ont été mis en évidence. Cependant, les mAChRs d'insectes, contrairement aux nAChRs, ont été beaucoup moins étudiés (Honda *et al.* 2007; Collin *et al.* 2013; Lü *et al.* 2020).

2.1. Aspects moléculaires et pharmacologiques des mAChRs d'insectes

Les premières études mettant en évidence l'existence de mAChRs chez les insectes remontent à la fin des années 1970 et le début des années 1980. L'utilisation de ligands radiomarqués comme le [^{3}H]QNB a permis de mettre en évidence des sites de fixation pour cet antagoniste non sélectif des mAChRs dans des extraits issus de têtes de mouches *D. melanogaster* et *M. domestica* (Dudai et Ben-Barak 1977; Jones et Sumikawa 1981). Les travaux de Jones et Sumikawa ont montré une forte affinité de la muscarine, de l'arécoline, de la scopolamine et de l'atropine pour le site de fixation au QNB par des expériences de liaison par compétition avec le [^{3}H]QNB (Jones et Sumikawa 1981). Plusieurs années plus tard, des expérimentations similaires ont été menées chez l'abeille *A. mellifera*, la blatte *P. americana*, la larve du sphinx du tabac *M. sexta* et la mouche *M. domestica* (Zhi-Yong Huang et Knowles 1990; Abdallah *et al.* 1991; Orr *et al.* 1992; Qazi *et al.* 1996). Les travaux d'Abdallah et collaborateurs ont montré, grâce à des expériences de liaison par compétition avec le [^{3}H]QNB sur des préparations de membrane d'abeille, que cet antagoniste pouvait être déplacé par le carbachol, l'oxotrémorine-M, l'ACh mais également par le 4-DAMP, la pirenzépine et l'AF-DX 116. Le site de fixation du [^{3}H]QNB présente une affinité plus importante pour le 4-DAMP que pour la pirenzépine ou l'AF-DX 116. Des résultats similaires ont été trouvés chez *P. americana* et *M. domestica* (Abdallah *et al.* 1991).

La première caractérisation moléculaire d'un récepteur muscarinique, nommé Dm1, a été réalisée par clonage chez *D. melanogaster* en 1989 (Onai *et al.* 1989). Le gène de ce récepteur, situé sur le chromosome 2, code pour une protéine présentant plus de 60% d'homologie avec les récepteurs de vertébrés ainsi qu'un profil d'hydrophobicité montrant la présence de 7 segments hydrophobes pouvant correspondre aux 7 segments transmembranaires (Onai *et al.* 1989). Ce récepteur a été exprimé dans un système hétérologue : les cellules de carcinome surrénalien de souris Y1. Des expériences de dosage des phosphoinositides par chromatographie d'échange d'ion ont montré que l'activation de Dm1 par le carbachol entraine une augmentation de l'incorporation de phosphoinositides dans la membrane. Cela suggère l'activation d'une PLC ou d'une phospholipase A2. De plus, l'activation du récepteur par le carbachol est bloquée par l'atropine ce qui indique qu'il s'agit d'un mAChR (Shapiro *et al.* 1989). Une lignée stable de cellules de drosophile appelées S2 exprimant ce récepteur Dm1 a permis de mettre en évidence que l'activation de ce récepteur par le carbachol entraine une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ *via* l'activation d'une PLC et la voie de l'IP3 (Millar *et al.* 1995; Cordova *et al.* 2003; Raymond-Delpech *et al.* 2004).

En 2011, soit près de 22 ans après le clonage de Dm1, un second mAChR a été cloné. Il s'agit de celui de la fourmi noire de chine : *Polyrhachis vicina*. Des analyses bio-informatiques ont révélé la présence des 7 segments transmembranaires, des 6 acides aminés conservés impliqués dans le site de fixation à l'ACh et des cystéines impliquées dans le pont disulfure entre les boucles e1 et e2. Des expérimentations de qPCR ont permis de mettre en évidence que le mAChR de *P. vicina* est moins exprimé chez les mâles que chez les femelles et les

ouvrières qui présentent une expression similaire. Enfin, des expérimentations d'hybridation *in situ* ont mis en évidence que chez ces insectes, ce mAChR est fortement exprimé dans le SNC, notamment dans les lobes antennaires, les lobes optiques, les corps pédonculés, le complexe central et les fibres du nerf optique. Sa caractérisation fonctionnelle et pharmacologique n'a pas encore été réalisée (Lü *et al.* 2011).

Grâce au séquençage du génome de divers insectes, le clonage et la caractérisation d'autres mAChRs d'insectes ont permis d'apporter de nouvelles connaissances sur ces récepteurs. Plus de 24 ans après le clonage du récepteur nommé Dm1 par Onaï et ses collaborateurs, des travaux ont mis en évidence que la séquence du Dm1 était incomplète et que la partie N-terminale comportait en réalité 240 nucléotides supplémentaires dans la séquence codante (Collin *et al.* 2013). Le clonage des mAChRs à partir du génome de *D. melanogaster* ont mis en évidence l'existence de 3 types de mAChRs, nommés mAChR-A (correspondant à la séquence complète du Dm1), mAChR-B et mAChR-C. Deux isoformes pour les mAChR-A et mAChR-B ont été identifiées. Les isoformes de ces deux types diffèrent dans la longueur de leur séquence. Une seule isoforme a été clonée pour le mAChR-C (Collin *et al.* 2013; Xia *et al.* 2016). Chez le ténébrion *T. castaneum*, deux isoformes des mAChR-B ont été clonées, mais une seule pour le mAChR-A (Collin *et al.* 2013). Bien qu'ils n'aient pas été clonés, des prédictions bio-informatiques ont mis en évidence la présence de mAChR-C chez le ténébrion *T. castaneum*, le ver à soie *B. mori* et le moustique *An. gambiae*, mais aussi l'absence de ce récepteur chez certaines espèces comme l'abeille A. *mellifera* ou la guêpe parasitoïde *N. vitripenis* (Xia *et al.* 2016). L'étude de l'expression des mAChR-A, mAChR-B et mAChR-C dans les différentes parties de *D. melanogaster* par qPCR montre que, chez les imagos de *D. melanogaster,* ces récepteurs sont majoritairement exprimés dans la tête, avec une expression plus importante chez les mâles que chez les femelles (Collin *et al.* 2013; Xia *et al.* 2016).

L'expression de ces récepteurs dans un système hétérologue a permis de montrer que les mAChR-A et mAChR-C sont couplés à la voie des phosphoinositides et que leur activation entraine une hausse de la concentration en calcium intracellulaire. L'activation des mAChR-B entraine une inhibition de l'adénylate cyclase et donc une diminution de l'AMPc cytosolique (Ren *et al.* 2015; Xia *et al.* 2016). La comparaison des séquences protéiques des mAChR-A et mAChR-B avec celles d'autres récepteurs muscariniques a mis en évidence des résidus hautement conservés au niveau des boucles i2 et i3 connues pour être impliquées dans le couplage aux protéines $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{i/o}$ respectivement (Ren *et al.* 2015). D'un point de vue pharmacologique (Tableau 2), les trois types de mAChRs sont activés par l'ACh. Les mAChR-A sont aussi activés par la muscarine et le mAChR-C par l'oxotrémorine-M. Les mAChR-B présentent la particularité d'être 1000 fois moins sensible à la muscarine que le mAChR-A. L'activation des mAChR-A et mAChR-C par l'ACh est bloquée par l'atropine et la scopolamine, ainsi que le QNB pour le mAChR-A, alors que les mAChR-B ne semblent sensibles à aucun de ces antagonistes. Les mAChR-B semblent donc présenter une pharmacologie atypique (Collin *et al.* 2013; Xia *et al.* 2016).

Beaucoup plus récemment, un autre récepteur muscarinique d'insecte a été cloné. En 2020, une étude est parue décrivant le mAChR-A de la chenille légionnaire du nord *Mythimna separata*. Comme pour le mAChR-A de drosophile, les prédictions bio-informatiques ont montré, dans la séquence du mAChR-A de *M. separata*, la présence des structures moléculaires caractéristiques des mAChRs ainsi que les résidus impliqués dans le couplage aux protéines de types $G\alpha_{q/11}$. De plus, l'expression de ce récepteur dans un système hétérologue, les cellules de mammifère HEK293, a confirmé que ce mAChR est couplé à la voie des phosphoinositides (Lü *et al.* 2020). Chez *M. separata*, l'analyse de l'expression de ce récepteur par qPCR a révélé qu'il était exprimé 11 fois plus dans les corps gras, 28 fois plus dans les ovaires et plus de 400 fois plus dans les tubes de Malpighi que

dans la tête. Comme chez *D. melanogaster*, les mAChR-A de *M. separata* présentent une expression dans la tête deux fois plus importante chez les mâles que chez les femelles (Collin *et al.* 2013; Lü *et al.* 2020). Des expériences d'immunohistochimie réalisées à l'aide d'un anticorps polyclonal ciblant la partie C-terminale du mAChR-A de *M. separata* ont montré des résultats similaires à ceux obtenus chez *P. vicina* (Lü *et al.* 2011). Ainsi, le mAChR-A de *M. separata* est exprimé dans les lobes antennaires, les lobes optiques, le complexe central, les fibres du nerf optique et les corps pédonculés. L'immunohistochimie a également confirmé la présence de ce récepteur dans les ovaires (Lü *et al.* 2020).

Type de mAChR	Agonistes (EC_{50} en M)	Antagoniste (IC_{50} en M)	Système d'expression	Référence
Mouche du vinaigre : *D. melanogaster*				
mAChR-A isoforme A	Acétylcholine ($3x10^{-8}$), Muscarine ($6x10^{-8}$)	Atropine ($<3x10^{-7}$), Scopolamine ($<3x10^{-7}$), QNB ($<3x10^{-7}$)	CHO	(Collin *et al.* 2013)
mAChR-A isoforme B	Acétylcholine ($4x10^{-8}$), Muscarine ($2x10^{-7}$)	Atropine ($<3x10^{-7}$), Scopolamine ($<3x10^{-7}$), QNB ($<3x10^{-7}$)	CHO	(Collin *et al.* 2013)
mAChR-B isoforme A	Acétylcholine ($2x10^{-7}$)	-	CHO	(Collin *et al.* 2013)
mAChR-B isoforme B	Acétylcholine ($3x10^{-7}$)	-	CHO	(Collin *et al.* 2013)
mAChR-C	Acétylcholine ($7,3x10^{-8}$), Oxotrémorine ($4,8x10^{-8}$)	Atropine ($<10^{-4}$), Scopolamine ($<10^{-4}$)	CHO-K1	(Xia *et al.* 2016)
Tribolium rouge de la farine : *Tribolium castaneum*				
mAChR-A	Acétylcholine ($3x10^{-8}$), Muscarine ($9x10^{-8}$)	Atropine ($<3x10^{-7}$), Scopolamine ($<3x10^{-7}$), QNB ($<3x10^{-7}$)	CHO	(Collin *et al.* 2013)
mAChR-B version courte	Acétylcholine ($3x10^{-8}$), Muscarine ($>10^{-7}$)	-	CHO	(Collin *et al.* 2013)
mAChR-B version longue	Acétylcholine ($2x10^{-7}$)	-	CHO	(Collin *et al.* 2013)
Chenille légionnaire orientale : *Mythimna separata*				
mAChR-A	Carbachol($1,2x10^{-7}$), Muscarine ($3,9x10^{-7}$)	Atropine ($9x10^{-11}$)	HEK-293	(Lü *et al.* 2020)

Tableau 2 : Pharmacologie des récepteurs muscariniques d'insectes exprimés en système hétérologue.

2.2. Localisation cellulaire des mAChRs chez les insectes

À l'heure actuelle, chez les insectes, deux fonctions neuronales ont été attribuées aux mAChRs. La première est attribuée aux récepteurs situés en présynaptique. Dans des synapses entre un neurone sensoriel et un motoneurone, l'activation d'un mAChR présynaptique entraine une diminution de la libération d'ACh dans la fente synaptique chez la blatte *P. americana* et le criquet *S. gregaria*. Il est intéressant de noter que ce mAChR peut être bloqué par l'AF-DX 116 ou la methoctramine (un antagoniste sélectif des sous-types M2 et M4 de mammifères) ce qui peut faire penser aux autorécepteurs de sous-type M2 existants chez les mammifères (Le Corronc *et al.* 1991; Leitch et Pitman 1995). Cependant, des travaux plus récents montrent chez le criquet *L. migratoria* que cette modulation de la libération d'ACh se ferait par l'intermédiaire d'un interneurone GABAergique qui porterait le mAChR. L'activation du mAChR sur l'interneurone GABAergique entrainerait une libération de GABA qui réduirait la libération d'ACh par le neurone sensoriel (Judge et Leitch 1999).

Chez la larve de *M. separata*, dans les synapses entre le neurone sensoriel des cils plantaires et le motoneurone plantaire rétracteur, il a été montré que l'activation des mAChRs postsynaptiques peut augmenter l'excitabilité du motoneurone en induisant des potentiels postsynaptiques excitateurs, mais aussi en déplaçant le seuil de déclenchement du potentiel d'action vers une valeur plus négative (Trimmer et Weeks 1989, 1993). Des résultats similaires ont été montrés sur les interneurones géants de *P. americana*, dans lesquels l'activation de mAChRs par la muscarine abaisse le seuil de déclenchement du potentiel d'action, mais aussi induit une lente dépolarisation, ce qui augmente l'excitabilité neuronale (Le Corronc et Hue 1993). Des études plus récentes ont montré que l'activation des mAChRs conduit à une augmentation de la fréquence de décharge des potentiels d'action dans les cellules de Kenyon du criquet *G. bimaculatus* (Terazima et Yoshino 2010). Ces cellules sont des neurones situés dans les corps pédonculés impliqués dans la mémoire chez les insectes. L'activation des mAChRs dans ces cellules entraine l'inhibition de canaux potassiques dépendants du sodium et ainsi augmente l'excitabilité des cellules de Kenyon (Hasebe et Yoshino 2016). Une étude plus récente, menée chez *D. melanogaster*, a montré cependant que le mAChR-A serait impliqué dans l'inhibition de la réponse des cellules de Kenyon en réponse à un stimulus odorant. En effet, à la suite de l'activation de ce récepteur dans ces cellules, une diminution de l'entrée de calcium dans les cellules de Kenyon de type γ a été observée (Bielopolski *et al.* 2019). Ainsi, ces résultats suggèrent que les récepteurs muscariniques chez les insectes peuvent jouer un rôle excitateur ou inhibiteur selon la signalisation activée dans les cellules.

2.3. Rôles physiologiques des mAChRs chez les insectes

2.3.1. Rôle des mAChRs dans le système moteur

Dans le système nerveux central des insectes, le générateur de rythmes centraux est un réseau de neurones générant une activité rythmique qui contrôle et coordonne les comportements moteurs de l'animal comme la locomotion ou la déglutition. Les « patterns » de signaux rythmiques générés par ces neurones peuvent être induits pharmacologiquement et de façon très similaire à ceux enregistrés *in vivo* (Ryckebusch et Laurent 1993). L'implication des mAChRs dans le système moteur des insectes a été étudiée dans des préparations diverses provenant de criquets *Schistocerca americana, Omocestus viridulus* et *Chorthippus biguttulus*, d'un phasme *Carausius morosus*, de la blatte *Periplaneta americana* ou encore de la mouche *Drosophila melanogaster* (Gorczyca *et al.* 1991; Ryckebusch et Laurent 1993; Büschges *et al.* 1995; Heinrich *et al.* 2001; Wenzel *et al.*

2002; Buhl *et al.* 2008; Okada *et al.* 2009; Krause *et al.* 2013). Il a été montré que la pilocarpine, un agoniste non sélectif des mAChRs, appliquée sur un ganglion thoracique isolé de criquet *Schistocerca americana* induit des trains de décharge dans les motoneurones des pattes (Ryckebusch et Laurent 1993). Des résultats similaires ont été démontrés chez le phasme *Carausius morosus.* De plus, chez le phasme, l'application d'atropine sur le ganglion thoracique bloque le rythme de décharge induit par la pilocarpine (Büschges *et al.* 1995). Une étude antérieure, chez *D. melanogaster*, a montré dans une préparation neuro-pharyngée de larve que l'application de muscarine et de pilocarpine sur la préparation induit des trains de décharge rythmés dans les muscles pharyngés similaires à l'activité naturelle endogène. De plus, l'atropine et la scopolamine peuvent bloquer cette activité rythmique, qu'elle soit d'origine endogène ou induite pharmacologiquement (Gorczyca *et al.* 1991). Des résultats similaires ont été montrés pour d'autres types de mouvement nécessitant une activité rythmée. La pilocarpine peut activer les décharges motrices rythmées déclenchant le vol chez le criquet *S. gregaria*, mais aussi induire l'activité rythmique du mouvement antennaire chez la blatte *P. americana* et le phasme *C. morosus*. Chacun de ces mouvements rythmés peut être bloqué par l'atropine (Buhl *et al.* 2008; Okada *et al.* 2009; Krause *et al.* 2013). Enfin, une étude plus récente a montré que les mAChR-A et mAChR-C jouent un rôle dans la modulation de la locomotion chez les larves de *D. melanogaster* (Malloy *et al.* 2019).

Les générateurs de rythmes centraux sont aussi impliqués dans des comportements spécifiques d'une espèce donnée, par exemple la stridulation chez les criquets. Chez les espèces de criquets *Omocestus viridulus* et *Chorthippus biguttulus*, la stimulation répétée des mAChRs du protocérébrum par la perfusion de muscarine dans la tête induit une augmentation de la durée de la stridulation. Le blocage de ce comportement par des inhibiteurs d'adénylate cyclase laissent supposer que l'effet stimulateur des mAChRs sur la stridulation se fait *via* la production d'AMPc (Heinrich *et al.* 2001). Des travaux ultérieurs ont montré que ce mécanisme ne dépendait pas seulement de la voie de l'AMPc, mais aussi de la voie de la PLC et de l'IP3. En effet, le blocage de la PLC par un inhibiteur, le U-73122, diminue fortement la durée de la stridulation induite par la muscarine (Wenzel *et al.* 2002).

L'ensemble de ces travaux montre une implication des mAChRs dans la motricité des insectes. Ces récepteurs sont impliqués dans l'induction de l'activité rythmique des générateurs de rythmes centraux, que ce soit dans les comportements de marche, de mouvements antennaires ou bien dans la stridulation chez certaines espèces. Les travaux les plus récents ont aussi montré une implication directe des mAChR-A et mAChR-C dans la modulation de l'activité des motoneurones.

2.3.2. Rôle des mAChRs dans la mémoire et l'apprentissage

Les premières études sur l'implication des mAChRs dans la mémoire chez les insectes ont été réalisées chez l'abeille *Apis mellifera*.

Le rôle des mAChRs dans la mémorisation a tout d'abord été étudié grâce à des expériences de conditionnement olfactif (Gauthier *et al.* 1994; Cano Lozano et Gauthier 1998; Cano Lozano *et al.* 2001). Le réflexe d'extension du proboscis peut être soumis à un conditionnement olfactif de type pavlovien. L'abeille reçoit une odeur (vanilline) pendant 6 secondes (stimulus conditionnel) qui sera associée à une stimulation sucrée au niveau des antennes (stimulus inconditionnel) selon les règles du conditionnement pavlovien. Ainsi, l'abeille associe l'odeur à la présence d'eau sucrée. Une fois l'abeille conditionnée, des tests de rappels sont menés où seul le stimulus olfactif présenté suffit à provoquer l'extension du proboscis. Afin de mesurer les capacités

mnésiques des abeilles, un test de rappel est effectué à différents temps après la fin du conditionnement et le pourcentage d'abeille étirant leur proboscis est mesuré. Une première étude a montré que l'injection de scopolamine, un antagoniste des mAChRs, 20 minutes après le conditionnement induit une diminution du pourcentage d'abeille étirant leur proboscis lors du test de rappel 30 minutes après l'injection. Cela suggère que le rappel de l'information implique l'activation des mAChRs (Gauthier *et al.* 1994). Une seconde étude, basée sur le même protocole, a montré que l'atropine induit une diminution du pourcentage d'abeille étirant leur proboscis lors du test de rappel effectué 20 minutes après l'injection alors que l'injection de pirenzépine n'a aucun effet. Ces résultats montrent que comme la scopolamine, l'atropine bloque le rappel de l'information chez l'abeille contrairement à la pirenzépine (Cano Lozano et Gauthier 1998). Enfin, une étude se concentrant sur les structures cérébrales impliquées dans l'apprentissage et la mémoire associative a montré que l'injection de scopolamine dans les lobes α des corps pédonculés induit une altération du processus de rappel de l'information contrairement à l'injection dans le calice des corps pédonculés qui n'a pas d'effet sur le mécanisme de rappel (Cano Lozano *et al.* 2001). Ainsi, les mAChRs des lobes α des corps pédonculés semblent impliqués dans la mémoire olfactive associative et plus particulièrement le rappel de l'information olfactive chez l'abeille.

Les corps pédonculés sont constitués de deux calices et d'un pédoncule divisé en deux lobes. On trouve dans cette structure un groupe de neurones nommés cellules de Kenyon. Les corps cellulaires et les dendrites des cellules de Kenyon sont localisés dans les calices et projettent leurs axones vers les lobes. La perturbation des synapses au niveau des corps pédonculés est associée à une altération des performances dans des épreuves d'apprentissage et de mémorisation (Ismail *et al.* 2006). Chez les abeilles, le volume des neuropiles des corps pédonculés augmente après une période de butinage de deux semaines, ce qui peut être interprété comme une augmentation des connexions synaptiques liées à l'acquisition de l'expérience de butinage. Les abeilles conservées en cages ou n'ayant réalisé qu'une semaine de butinage ne présentent pas d'augmentation significative du volume des neuropiles. Cependant, les abeilles conservées en cage, mais traitées oralement avec de la pilocarpine présentent une augmentation significative du volume des neuropiles comparable à celle observée chez les abeilles ayant butiné pendant deux semaines. De plus, la scopolamine bloque cette augmentation du volume des neuropiles des corps pédonculés induite par la pilocarpine (Ismail *et al.* 2006). Ces résultats suggèrent que les mAChRs jouent un rôle dans la plasticité synaptique, induite par l'expérience, dans les cellules de Kenyon chez les abeilles.

Une autre étude a été menée sur la reconnaissance olfactive des individus provenant de la même ruche. Les abeilles d'une même ruche présentent une signature olfactive et la présence d'un individu ne présentant pas cette signature déclenche un comportement agressif. Il arrive cependant, dans environ 30% des cas, que l'abeille ne reconnaisse pas cette signature et qu'une agression survienne sur un congénère de la même ruche (Ismail *et al.* 2008). Les abeilles traitées oralement avec de la pilocarpine présentent un plus faible taux d'erreur dans la reconnaissance d'individus de la même colonie. À l'inverse, les abeilles traitées oralement avec de la scopolamine font plus d'erreurs et présentent un taux supérieur d'agression contre les individus de la même colonie. L'agressivité envers les individus étrangers à la colonie n'est pas impactée par les traitements (Ismail *et al.* 2008). Une étude similaire a été menée sur les fourmis *Pogonomyrmex barbatus*. Les résultats de cette étude montrent que le traitement oral à la scopolamine n'induit pas d'inhibition de l'olfaction, mais que les fourmis traitées ne sont plus en mesure de reconnaitre les individus de leur colonie (Coates et Robertson 2013). Ainsi, les résultats de ces travaux suggèrent que les mAChRs sont impliqués dans le traitement des informations olfactives régulant

la reconnaissance des congénères et dans la reconnaissance de l'odeur d'un congénère (Ismail *et al.* 2008; Coates et Robertson 2013).

Chez *D. melanogaster*, que ce soit au stade larvaire ou au stade imago, des protocoles ont été développés pour étudier l'apprentissage de l'association d'une odeur avec un stimulus aversif (sel, choc électrique…). Il a été montré chez les larves de drosophile que le mAChR-A était exprimé dans les corps pédonculés. Le blocage de ce mAChR avec de l'atropine abolit la faculté des larves à générer une mémoire olfactive aversive. La déplétion du mAChR-A dans les corps pédonculés par KO abolit également la mémoire olfactive aversive des larves (Silva *et al.* 2015). Des travaux plus récents, réalisés sur des imagos de drosophiles conditionnées à associer une odeur avec un stimulus aversif, ont montré par des analyses comportementales et de l'imagerie fonctionnelle que le mAChR-A des cellules de Kenyon était requis dans l'apprentissage de l'association d'une odeur avec un stimulus aversif. Chez la drosophile, la mémoire aversive consiste en un affaiblissement de la capacité des synapses à transmettre le signal entre les cellules de Kenyon et les neurones émergents des corps pédonculés. Or, chez les drosophiles dont l'expression du mAChR-A a été altérée par l'ARN interférence dans les cellules de Kenyon, cet affaiblissement des synapses ne se fait plus. Ainsi, le mAChR-A joue un rôle dans la plasticité synaptique nécessaire à la mémoire olfactive aversive (Bielopolski *et al.* 2019).

L'ensemble de ces travaux indique que les récepteurs muscariniques d'insecte sont impliqués dans l'apprentissage, la mémorisation, mais également dans la plasticité synaptique.

2.3.3. Rôle des mAChRs dans les systèmes sensoriels

Deux études récentes ont montré l'implication de récepteurs muscariniques dans des systèmes sensoriels chez *D. melanogaster*.

Chez *D. melanogaster*, les substances odorantes sont détectées par les neurones olfactifs présents dans les antennes et les palpes maxillaires. Chaque neurone exprime un seul récepteur pouvant détecter plusieurs molécules odorantes (Leal 2013). Ces neurones projettent leurs axones dans les glomérules des lobes antennaires et chaque glomérule est le site de convergence d'un type de neurone récepteur (Jefferis 2005). Ainsi, une carte des afférences olfactives au niveau glomérulaire a pu être déterminée (Fishilevich et Vosshall 2005). Chaque glomérule contient de nombreux neurones de projection (Sachse *et al.* 2006; Das Chakraborty et Sachse 2021). Ces neurones de projection peuvent être cholinergiques excitateurs, mais aussi GABAergiques inhibiteurs. Ces neurones sont chargés d'envoyer des informations vers d'autres structures comme les corps pédonculés. Il existe en plus des neurones de projection, des interneurones locaux (Sachse *et al.* 2006; Das Chakraborty et Sachse 2021). Ils sont souvent multiglomérulaires et peuvent être cholinergiques excitateurs, mais aussi GABAergique ou glutamatergiques inhibiteurs. Ces neurones locaux modulent sélectivement l'activité des neurones de projection de façon à définir un codage de l'information olfactive en régulant les informations sortantes de chaque glomérule (Galizia 2014). L'activation des neurones olfactifs entraine une libération d'ACh dans les lobes antennaires. Cette libération d'ACh active les mAChR-A sur les neurones locaux inhibiteurs provoquant une augmentation de leur activité. Cela entrainera l'inhibition de certains neurones de projection excitateurs et modulera les informations sortant du lobe antennaire. Le mAChR-A joue donc un rôle dans le codage des informations olfactives (Rozenfeld *et al.* 2019).

Le système olfactif n'est pas le seul système sensoriel chez *D. melanogaster* dans lequel les mAChRs jouent un rôle. Une étude récente a montré l'implication des mAChRs dans le système visuel. Les stimuli lumineux

sont détectés au moyen de cellules photoréceptrices. Les larves de drosophiles expriment de chaque côté de leur corps seulement 12 cellules photoréceptrices. Ces cellules font chacune des connexions avec une paire d'interneurones locaux dans les neuropiles optiques, mais aussi avec des neurones de projection qui transmettent l'information aux autres structures cérébrales. La paire d'interneurones est constituée d'un neurone cholinergique excitateur et d'un neurone glutamatergique inhibiteur. Les travaux de Qin *et al.* en 2019 ont mis en évidence que ces neurones étaient responsables de la signalisation ON/OFF respectivement, ce qui permet de coder la détection de la lumière ou de l'obscurité. En réponse à la lumière, le neurone glutamatergique s'hyperpolarise, alors que le neurone cholinergique se dépolarise. L'inhibition de l'expression du mAChR-B par l'ARN interférence entraine la suppression de la réponse de l'interneurone glutamatergique aux stimuli lumineux. Ainsi, le mAChR-B est impliqué dans le codage de la détection de l'obscurité chez les larves de *D. melanogaster* (Qin *et al.* 2019).

Ces deux études montrent l'implication de deux types de mAChRs dans les systèmes sensoriels olfactifs et visuels. Dans ces systèmes, les mAChRs semblent impliqués dans la modulation de l'excitabilité nerveuse et donc dans le codage des informations visuelles et olfactives.

Objectifs

Depuis plusieurs années, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), famille de protéines à laquelle appartiennent les mAChRs, sont considérés comme des cibles potentielles pour de nouveaux insecticides (Hill *et al.* 2018; Liu *et al.* 2021). En effet, les fonctions essentielles des RCPG dans la physiologie cellulaire et le comportement des insectes permettent de considérer ces récepteurs comme des cibles d'importance pour le développement de nouvelles substances pour le contrôle des insectes ravageurs des cultures ou vecteurs de maladie. Les récepteurs couplés aux protéines G, bien qu'étant la cible de 34% des molécules d'intérêt en thérapeutique humaine, restent des cibles sous-exploitées dans le domaine phytosanitaire (Pietrantonio *et al.* 2018). Parmi ces RCPG, seuls les récepteurs à l'octopamine sont des cibles d'insecticides (Ozoe 2021). Sachant que l'acétylcholine est le principal neurotransmetteur dans le système nerveux des insectes, les récepteurs cholinergiques de type nicotinique sont des cibles privilégiées des insecticides neurotoxiques. Cependant, les récepteurs cholinergiques de type muscariniques (mAChRs) pourraient également jouer un rôle important dans la lutte contre ces insectes nuisibles. De plus, des travaux menés au laboratoire ont montré que, chez la blatte *P. americana*, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'activation des mAChRs pouvait augmenter la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides (Abd-Ella *et al.* 2015; Moreau *et al.* 2020). Ainsi, ces mAChRs pourraient être considérés comme des facteurs importants dans le développement de nouvelles stratégies de lutte en tant que cible d'un insecticide ou en tant que modulateur de l'effet d'un insecticide. Cependant, chez les insectes, les mAChRs sont peu caractérisés d'un point de vue moléculaire. Les principales données disponibles proviennent d'études réalisées chez la drosophile *D. melanogaster* (Collin *et al.* 2013; Ren *et al.* 2015; Xia *et al.* 2016). Ce travail de thèse s'inscrit donc dans une problématique générale portant sur une meilleure connaissance des récepteurs muscariniques d'insectes afin de les identifier comme des cibles spécifiques des insectes nuisibles tout en épargnant les insectes non-cibles tels que les insectes bénéfiques. Cette étude porte sur la caractérisation moléculaire et pharmacologique des mAChRs d'insecte vecteur de maladie et plus particulièrement ceux du moustique *Anopheles gambiae*, principal vecteur du paludisme. Ainsi, à partir des données connues chez la drosophile et la blatte, les objectifs de ce travail de thèse sont : i) d'identifier les différents mAChRs exprimés chez le moustique *An. gambiae*, ii) d'étudier la pharmacologie de ces mAChRs et les voies de signalisation activées par ces récepteurs en les exprimant dans un système hétérologue, les cellules *Sf*9 et iii) d'évaluer le potentiel des mAChRs comme cibles d'agents synergisants d'un insecticide permettant ainsi d'augmenter la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides.

Matériels, méthodes et modèles d'études

1. Moustique *Anopheles gambiae*

Le modèle utilisé dans cette étude est le moustique *Anopheles gambiae*, et plus particulièrement la souche de laboratoire Kisumu.

D'un point de vue taxonomique, le genre *Anopheles* appartient à la sous-famille des *Anophelinae* au sein de la famille de *Culicidae*. Le genre *Anopheles* regroupe 484 espèces réparties en 6 sous-genres : *Anopheles*, *Cellia*, *Nyssorhynchus*, *Kerteszia*, *Lophopodomyia* et *Stethomyia*. *Anopheles gambiae,* le principal vecteur du paludisme, fait partie du sous-genre *Cellia* (Carnevale et Robert 2009).

Les moustiques sont des insectes holométaboles (métamorphose complète). Cela signifie que l'imago, la nymphe et la larve présentent des formes différentes, adaptées à leur mode de vie : aquatique pour les stades préimaginaux et aérien pour le stade imago (Figure 14). Le stade larvaire aquatique consiste en une période de croissance divisée en quatre stades numérotés de I à IV. La durée du stade larvaire est variable selon les espèces et les conditions de température. Les larves et nymphes sont aquatiques, mais ont une respiration aérienne. Elles peuvent selon les espèces coloniser différents gîtes larvaires. On peut les retrouver en eau douce ou saumâtre, en zones ensoleillées ou ombragées, en eau stagnante ou courante, avec ou sans végétation dressée, dans des marais, des trous d'arbres ou bien encore des gîtes non naturels comme les citernes (Carnevale et Robert 2009). La première métamorphose complète est le passage de l'état larvaire à l'état de nymphe (ou pupe). Ce stade de la vie du moustique est court et dure généralement un à deux jours, mais peut durer jusqu'à 5 jours en cas de température basse. Au cours de la nymphose, de nombreuses modifications internes ont lieu en vue de la métamorphose en adulte (ou imago). Lors de la métamorphose permettant le passage du stade nymphe au stade imago, la nymphe se positionne à la surface de l'eau. La face dorsale se fend longitudinalement et l'imago sort hors de l'eau (Carnevale et Robert 2009). À l'état d'imago, deux comportements prédominent : alimentation et reproduction. Le cycle gonotrophique consiste en une succession de phénomènes physiologiques entre deux repas sanguins. Il a été décrit pour la première fois par Beklemishev en 1940 (Carnevale *et al.* 1979). Il se découpe en trois phases. La première est la recherche d'un hôte par une femelle à jeun pour effectuer son repas sanguin. Cette première phase se termine lorsque le repas de sang est fini. Ensuite, la seconde phase correspond à une phase de digestion du sang, couplée à la maturation des follicules ovariens. Enfin, la troisième phase consiste en la recherche d'un lieu de ponte et du dépôt des œufs. (Carnevale *et al.*, 1979; Carnevale *et* Robert, 2009).

Les moustiques de la souche Kisumu dont les œufs sont fournis par le laboratoire MIVEGEC (UMR IRD-CNRS-Université de Montpellier) sont maintenus au laboratoire SiFCIR à une température de 28°C et à un taux d'humidité relative de 80%. Une alternance 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité correspondant à un cycle jour/nuit est réalisée. Dès leur réception, les œufs sont immergés dans des bacs d'eau déminéralisée afin de permettre leur développement. Après éclosion, les larves sont nourries avec de l'aliment complet pour poisson (tétraMin) qui est broyé, tamisé et déposé à la surface de l'eau. Une fois les moustiques au stade de nymphe, ils sont transférés dans un cristallisoir rempli d'eau déminéralisée placé dans une cage entourée d'une moustiquaire. Après la mue imaginale, les imagos sont placés dans une cage entourée d'une moustiquaire. Ils seront alors nourris avec une solution de miel biologique à 10% déposée sur un coton.

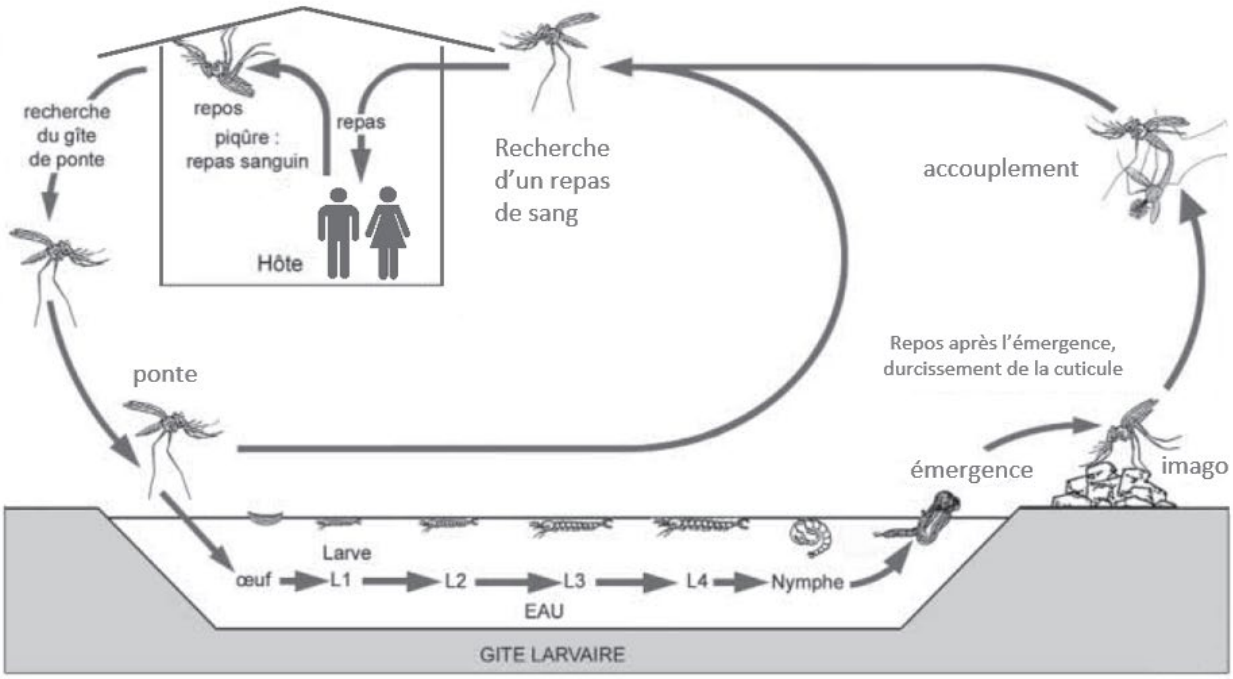

Figure 14 : Schéma représentant le cycle de vie des moustiques femelles.
Modifiée d'après Carnevale et Robert 2009

2. Identification des séquences et quantification de l'expression des mAChRs d'*An. gambiae*

2.1. Identification et analyse des séquences protéiques des mAChRs dans le génome du moustique *Anopheles gambiae* par analyse bio-informatique

Le génome d'*An. gambiae* étant séquencé (Holt *et al.* 2002; Mongin *et al.* 2004; Sharakhova *et al.* 2007), la recherche dans les bases de données du NCBI est donc possible afin d'identifier les séquences codantes des mAChRs. Ainsi, les séquences protéiques des différentes isoformes des mAChR-A (isoforme A : NP_726440.1 et isoforme B : NP_523844.2), mAChR-B (isoforme A : NP_649764 et isoforme B : NP_001287221) et mAChR-C (NP_572358.1) connues chez *D. melanogaster* (Collin *et al.* 2013; Ren *et al.* 2015; Xia *et al.* 2016) ont été utilisées pour cribler la base de données des séquences protéiques non redondantes d'*An. gambiae* au moyen du logiciel Blastp. Les séquences protéiques retenues sont celles présentant le plus grand score et la plus grande identité avec les séquences de la drosophile et sont utilisées pour déterminer la séquence nucléotidique correspondante dans la base de données Gene (NCBI). Afin de vérifier que les séquences identifiées sont bien des mAChRs, des analyses des séquences protéiques sont réalisées au moyen d'autres logiciels. La prédiction des sept segments transmembranaires est réalisée avec le logiciel TMHMM, les ponts disulfures entre les cystéines avec le logiciel ScanProsite et les alignements entre les séquences d'anophèle et de drosophile sont réalisés avec Clustal Omega pour permettre d'identifier des résidus conservés chez les mAChRs. Le poids moléculaire et le point isoélectrique ont été prédits au moyen du logiciel pI/Mw tool sur le site ExPASy.

2.2. Clonage des différents mAChRs d'*An. gambiae*

Les clonages des différentes séquences nucléotidiques codantes pour les mAChRs *d'An. gambiae* ont été réalisés au moyen du kit Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit (Invitrogen). Ce kit permet l'insertion des séquences dans un vecteur de clonage, le plasmide pCR-Blunt-II-TOPO™.

2.2.1. Amplification par PCR des séquences codantes des mAChRs

L'amplification des séquences des mAChRs par PCR nécessite une matrice d'ADNc permettant la fixation des amorces puis l'amplification des brins complémentaires correspondants. Ces ADNc sont issus d'une rétrotranscription effectuée à partir de 4µg d'ARN provenant de cellules du système nerveux d'anophèles en utilisant une amorce d'oligodT.

Les cellules de système nerveux d'*An. gambiae* sont extraites par dissociation mécanique à partir de têtes d'anophèles. Pour ce faire, des anophèles mâles, femelles ainsi que des larves sont endormis dans un tube placé dans de la glace. Pour chaque échantillon, les ARN sont extraits à partir de 100 têtes de moustique mâle, de moustique femelle ou de larve. Pour les imagos, les antennes, les palpes et le corps sont découpés sous loupe binoculaire au moyen d'un ciseau fin, et les pédicelles sont retirés à l'aide d'aguilles montées. Les têtes sont ensuite placées dans un microtube contenant 1ml de liquide physiologique composé de NaCl (130mM), de KCl (2,5mM), de $CaCl_2$ (5mM), de $MgCl_2$ (3mM) et d'HEPES (5mM) avec un pH ajusté à 7,1. La dissociation mécanique est réalisée par aspiration puis reflux des têtes à travers des pipettes pasteur de diamètre décroissant jusqu'à l'obtention d'une suspension de cellules nerveuses.

L'extraction des ARN totaux est réalisée au moyen du kit d'extraction Nucleospin RNA® (Macherey-Nagel). Après son obtention, la suspension de cellules nerveuses est centrifugée (10 minutes à 5000g à 4°C) et le culot cellulaire est remis en suspension dans 350µl de tampon RA1 auquel est ajouté 3,5µl de β-Mercaptoéthanol conduisant alors à la lyse des cellules et à l'inactivation des RNAses. Le mélange est transféré dans une colonne contenant un filtre permettant l'élimination des débris de cellules et de cuticule restants. Après une centrifugation d'1 minute à 11 000g, 350µl d'éthanol à 70% sont ajoutés à l'éluat afin de précipiter les acides nucléiques. Le milieu réactionnel est alors transféré dans une nouvelle colonne contenant une membrane de silice permettant la fixation des acides nucléiques. Après une centrifugation de 30 secondes à 11 000g, un lavage de la membrane est réalisé avec 350µl de tampon MDB suivi d'une centrifugation d'1 minute à 11 000g afin d'éliminer les sels. Une dégradation des ADN est ensuite réalisée par digestion enzymatique. 95µl d'une solution de rDNase sont déposés sur la membrane et une incubation de 15 minutes à température ambiante est effectuée. L'ajout de 200µl de tampon RAW2 permet l'arrêt de la digestion. À la suite d'une centrifugation de 30 secondes à 11 000g, un premier lavage est réalisé avec 600µl de tampon RA3 suivi d'une centrifugation de 30 secondes à 11 000g. Un second lavage avec 250µl de tampon RA3 est suivi d'une centrifugation de 2 minutes à 11 000g permettant l'élimination des tampons restants dans la membrane de silice. 60µl d'H_2O ultra-pure sont déposés dans la colonne. Puis, une incubation de 2 minutes est réalisée avant d'éluer l'ARN grâce à une centrifugation de 30 secondes à 11 000g. Afin de concentrer les ARN pour la rétrotranscription, une précipitation est réalisée. Pour ce faire, les 60 µl d'ARN sont placés une nuit à -80°C après un ajout de 1µl de glycogène (20µg/µl), 6µl d'acétate de sodium (3M, pH=5,2) ainsi que 134µl d'éthanol absolu. À la suite d'une centrifugation de 15 minutes à 15 000g à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est conservé. Ce culot d'ARN est lavé avec 700µl d'éthanol 70%. Une centrifugation de 15 minutes à 15 000g à 4°C est réalisée, puis le surnageant est retiré. Un second lavage identique est réalisé. Suite à ces lavages, les ARN sont resuspendus dans 12µl d'H_2O ultra-pure. La quantité et la qualité des ARN extraits sont évaluées par une mesure spectrophotométrique UV (SimpliNano, GE healthcare).

Pour amplifier les séquences nucléotidiques codantes pour les mAChRs, une étape de rétrotranscription des ARNm est réalisée au moyen du kit Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis® (Thermo Scientific). Pour ce faire, 4µg d'ARN totaux sont incubés pendant 5 minutes à 65°C en présence d'1µl d'amorces oligo$(dT)_{18}$ (0,5µg/µl) et d'H_2O ultra-pure (qsp 12µl) pour que les amorces puissent s'hybrider à la queue poly(A) des ARNm. Un mélange réactionnel composé de 4µl de tampon de réaction 5X, 1µl de Ribolock RNase Inhibitor (20U/µl), 2µl de dNTP (10mM) et 1µl d'enzyme RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/µl) est ajouté. La réaction de rétrotranscription est effectuée à 42°C pendant 1 heure puis l'enzyme est inactivée par une incubation de 5 minutes à 70°C.

L'amplification des séquences codantes des mAChRs qui sont à insérer dans le plasmide pCR-Blunt est réalisée à partir des ADNc obtenus par rétrotranscription, en utilisant une ADN polymérase haute-fidélité : la KOD Hot Start®. Pour chaque réaction, le mélange suivant est utilisé : 2µl de tampon de réaction KOD 10X, 0,4µl de dNTP (10mM), 1,2µl de $MgSO_4$ (10mM), 0,4µl d'enzyme KOD Hot start (1U/µl, Novagen), 0,6µl d'amorce sens (Tableau 3 ; 10µM) et 0,6µl d'amorce anti-sens (Tableau 3 ; 10µM), 13,8µl d'H_2O ultra-pure et 1µl d'ADNc (100ng/µl). Les conditions expérimentales de PCR sont constituées d'une étape de dénaturation initiale de 2 minutes à 95°C suivie de 35 cycles successifs composés d'une étape de dénaturation de 20 secondes à 95°C, d'une étape d'hybridation de 20 secondes à la température d'hybridation des amorces (Tableau 3) et d'une étape d'élongation de 90 secondes à 70°C et enfin d'une étape d'élongation finale de 7 minutes à 70°C.

Type	Variant	Numéro d'accession	Amorces sens (5'-3')	Amorces anti-sens (5'-3')	Site de restriction :	Th
mAChR-A	-	XM_314486.3	GGAATTCCATGGGTGGGTTTCCGTT	GCTCTAGAGCTCAGTTATAGACACCCCG	Sens : EcoRI Anti-sens : XbaI	65°C
mAChR-B	1	XM_003436842.1	GGGGTACCCCATGTTAAATTATCCTGAA	CGGGATCCCGTTATGTCATATGCAA	Sens : KpnI Anti-sens : BamHI	50°C
	2	XM_313548.1	GGGGTACCCCATGTTAAATTATCCTGAA	CGGGATCCCGTTATGTCATATGCAA	Sens : KpnI Anti-sens : BamHI	50°C
mAChR-C	-	XM_310742.3	GGGGTACCCCATGGCGACGACCGCTGATG	GCTCTAGAGCCTAAAGCTTGGTCACATTCATC	Sens : KpnI Anti-sens : XbaI	65°C
M13	-	-	AAAACGACGGCCAG	CAGGAAACAGCTATGA	-	55°C
PIB	-	-	CGATCTGGTAAACACAGTTGAACAGCATCT	GAGACCGAGGAGAGGGTTAGGG	-	60°C

Tableau 3 : Tableau résumant la séquence des amorces utilisées pour le clonage moléculaire, le numéro d'accession des séquences utilisées pour leur conception et la température d'hybridation (Th). Les sites de restriction ajoutés en amont des codons ATG et Stop au sein des amorces sont indiqués en rouge.

2.2.2. Purification des amplicons obtenus par PCR

Une migration électrophorétique des produits de la PCR et du marqueur de taille 1Kb+ (Invitrogen) est réalisée sur un gel d'agarose à 0,8%. Les produits de la PCR à la taille prédite sont purifiés au moyen du kit Nucleospin® Gel et PCR clean-up (Macherey Nagel). Après une découpe du gel sur un banc UV, 100mg de gel d'agarose contenant les amplicons d'intérêt sont incubés à 50°C en présence de 200µl de tampon NTI jusqu'à la dissolution totale du gel. Les amplicons d'intérêt en solution sont alors fixés sur une membrane de silice après une centrifugation de 30 secondes à 11 000g. Après différents lavages, les produits de PCR sont finalement élués dans 30µl d'H_2O (centrifugation d'une minute à 11 000g). La quantité et la qualité des amplicons purifiés sont évaluées par une mesure spectrophotométrique UV (SimpliNano, GE healthcare).

2.2.3. Insertion des séquences codantes des mAChRs dans le vecteur de clonage pCR-Blunt

Les produits de PCR purifiés sont insérés dans le vecteur pCR-Blunt du kit Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen), au moyen d'une ligase, selon un ratio 10/1 (insert/vecteur). Le mélange réactionnel est composé d'1µl de plasmide (25ng/µl), 6µl d'insert purifié, 2µl de tampon de réaction 5X ExpressLink T4 DNA ligase et 1µl d'enzyme ExpressLink T4 DNA ligase (5U/µl). Chaque tube est incubé 30 minutes à température ambiante puis toute la nuit à 4°C.

2.2.4. Transformation de bactéries compétentes par choc thermique et criblage des clones recombinants

Une transformation de bactéries *E. Coli* One Shot© Top 10 chimiocompétentes (Invitrogen) est réalisée avec 4µl de produit de ligation par choc thermique (30 minutes dans la glace suivies de 45 secondes à 42°C et de 2 minutes dans la glace). Les bactéries transformées sont incubées 1 heure à 37°C dans 250µl de milieu SOC (Tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, $MgCl_2$ 10mM, $MgSO_4$ 10mM, glucose 20mM). Elles sont ensuite étalées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu sélectif LB-agar (Tryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 1%, agar 1,5%) additionné de kanamycine (50µg/ml) puis incubées une nuit à 37°C. Le vecteur pCR-Blunt contient un gène de résistance à la kanamycine ce qui permet la sélection des clones transformés.

Les clones recombinants sont mis en préculture en plaque 96 puits avec 150µl de LB-agar/kanamycine durant 3h sous agitation (225rpm) à 37°C puis sélectionnés à l'aide d'une PCR utilisant les amorces M13 spécifiques des séquences plasmidiques entourant l'insert (Tableau 3). Chaque amplification est réalisée avec 2µl de suspension bactérienne, 4µl de tampon de réaction de l'ADN polymérase GoTaq® coloré (5X), 0,4µl de dNTP (10mM), 0,1µl d'ADN polymérase GoTaq® (5U/µl, Promega), 0,5µl d'amorce M13 sens (Tableau 3, 10µM), 0,5µl M13 anti-sens (Tableau 3, 10µM) et 12,4µl d'H_20 ultra-pure selon les conditions expérimentales suivantes : une étape de 3 minutes à 95°C puis 30 cycles de 20 secondes à 95°C, 10 secondes à la température d'hybridation des amorces M13 (Tableau 3) et 3 minutes à 70°C, et une étape finale de 7 minutes à 70°C. Après une migration électrophorétique des produits de PCR sur un gel d'agarose à 0,8%, les clones ayant incorporé les plasmides recombinés sont mis en culture durant la nuit dans 5ml de milieu LB-kanamycine à 37°C sous agitation (225rpm).

2.2.5. Purification des plasmides recombinés

À partir des cultures bactériennes, l'extraction et la purification des plasmides recombinés sont entreprises à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid® (Macherey-Nagel). Après avoir conservé 1ml de suspension bactérienne en présence de glycérol (25%) à -80°C, la suspension bactérienne est centrifugée (5 minutes à 11 000g) et le culot bactérien est remis en suspension dans 250µl de tampon A1. 250µl de tampon A2 sont ensuite ajoutés et une incubation de 10 minutes à température ambiante conduit à la lyse des bactéries, à la dégradation des protéines et à la libération des plasmides. L'ajout de 300µl de tampon A3 stoppe la lyse bactérienne et neutralise le lysat. Une centrifugation de 5 minutes à 11 000g permet d'éliminer les protéines, l'ADN génomique et les débris bactériens qui se retrouvent alors dans un précipité. Le surnageant est alors transféré dans une colonne constituée d'une membrane de silice permettant la fixation de l'ADN plasmidique. Après une centrifugation d'1 minute à 11 000g, un premier lavage de la membrane avec 500µl de tampon AW préchauffé à 50°C est réalisé. Une seconde centrifugation d'1 minute à 11 000g et un second lavage avec 600µl de tampon A4 sont réalisés. Puis, deux centrifugations successives (1 minute puis 2 minutes à 11 000g) permettent de sécher complètement la membrane. Enfin, l'ADN est élué avec 50µl d'H_2O ultra-pure à la suite d'une centrifugation d'1 minute à 11 000g. La quantité et la qualité des ADN plasmidiques extraits et purifiés sont mesurées par spectrophotométrie UV et la séquence de ces inserts est vérifiée par séquençage (Eurofins).

2.3. Quantification de l'expression des ARNm des mAChRs dans les cellules du système nerveux d'anophèle.

L'analyse de l'expression des transcrits des mAChRs dans les têtes d'anophèles est effectuée au moyen de la technique de PCR quantitative. Chaque réaction est réalisée avec 10µl de tampon de réaction MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay Low ROX (Eurogentec), 2,5µl d'amorces sens et antisens (10µM ; Tableau 4), 4µl d'H_2O et 5µl d'ADNc de suspension de cellules nerveuses provenant de têtes d'*An. gambiae* mâle, femelle ou de larve dilués au 1/100. Les conditions d'expérimentation comprennent une première étape de dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C suivie de 40 cycles de 15 secondes à 95°C, 45 secondes à la température d'hybridation (Tableau 4) et 1 minute à 72°C. Une étape additionnelle de courbe de dissociation (« melting curve ») permettant l'augmentation progressive de la température de 50°C à 95°C est réalisée afin de vérifier la spécificité des amorces. Toutes les réactions sont réalisées en duplicat et les données sont normalisées avec le gène *rps7* codant pour la protéine ribosomale S7 de la sous-unité 40S. L'intensité de la fluorescence est détectée par un thermocycleur Chromo4™ (Biorad) et les données sont analysées avec le logiciel Opticon Monitor™ 3.1. L'expression relative de chaque mAChR est calculée selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et Schmittgen 2001). L'analyse des résultats est réalisée au moyen du logiciel GraphPad Prism (version 8.00, GraphPad Software).

Type	Variant	Numéro d'accession	Amorce sens (5'-3')	Amorce Anti-sens (5'-3')	Th
mAChR-A	-	XM_314486.3	TCCGTGATCCATATGTGGCC	TGAGGATGGTGTACACGGAG	65°C
mAChR-B	1	XM_003436842.1	CTTGGACAGTGCGGATCTA	CGTATCAGGACTGTTGGTGA	60°C
	2	XM_313548.1	CCATGACAGATCCACC	CATTCCTGCTACAGATGA	55°C
mAChR-C	-	XM_310742.3	GAGTGTGAGTTCGACGAGCTG	GGTATCCAGCAGAAGGTAAAGCA	65°C
rps7	-	L20837.1	GCCATCCTGGAGCTGGAGATGAA	GACGGGTCTGTACCTTCTGGA	65°C

Tableau 4 : Tableau résumant la séquence des amorces utilisées en PCR quantitative, le numéro d'accession des séquences utilisées pour leur conception et la température d'hybridation (Th).

3. Expression des mAChRs dans un système hétérologue, les cellules *Sf*9

3.1. Modèle cellulaire : les cellules *Sf*9

Les cellules *Sf*9 sont une lignée cellulaire dérivant des cellules *Sf*21, elles-mêmes dérivant de tissus ovariens de la pupe de la Noctuelle américaine du maïs *Spodoptera frugiperda* (Schneider et Seifert 2010). Elles sont un modèle adapté à notre étude de par la présence de nombreuses protéines permettant la transduction du signal des RCPGs telles que les protéines G ($G\alpha_q$, $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_o$), l'adenylate cyclase et la phospholipase C (Schneider et Seifert 2010). Elles ont de plus été utilisées comme modèle pour l'étude des récepteurs muscariniques humains (Kukkonen *et al.* 1996, 1998).

Ce sont des cellules rondes (Figure 15) cultivées à la température de 28°C. Leur culture ne requiert pas de supplémentation en CO_2. Les cellules *Sf*9 peuvent être cultivées soit en suspension sous agitation à 150rpm avec une densité de $1x10^6$ à $6x10^6$ cellules/ml, soit par adhésion au plastique en flasque de culture. Dans le cas d'une culture en flasque, les cellules formeront une monocouche qui se détache une fois la culture à confluence (Schneider et Seifert 2010).

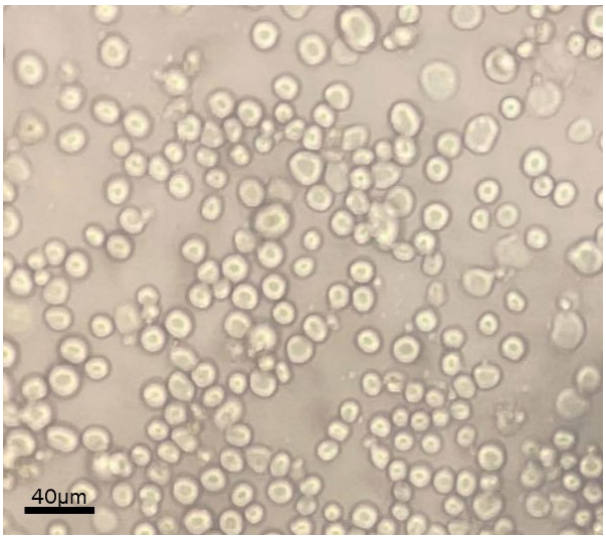

Figure 15 : Photographie de cellules *Sf*9.

L'expression des gènes d'intérêt en cellules *Sf*9 se fait principalement de deux façons, l'utilisation de baculovirus infectant les cellules d'*Autographa californica* et la transfection de plasmides au moyen d'un lipoplexe (Kiely *et al.* 2007). La première méthode consiste en l'insertion de la séquence du gène d'intérêt dans l'ADN du virus recombinant à la suite d'un promoteur constitutif fort. L'infection des cellules avec le virus recombiné permet l'intégration du génome viral dans celui de la cellule et l'expression de la séquence d'intérêt. L'inconvénient de l'utilisation de cette famille de virus, c'est que l'infection conduit à la lyse des cellules (Schneider et Seifert 2010). La seconde méthode, que nous avons choisi d'employer, permet de contourner ce problème de lyse cellulaire. Parmi les vecteurs plasmidiques existants, le plasmide pIB/V5-His est adapté pour l'expression en cellules *Sf*9. En effet, ce plasmide étant sous le contrôle du promoteur OpIE2, provenant du virus *Orgyia pseudotsugata*

multiple nucléopolyèdre, permet l'expression du gène d'intérêt dans les lignées cellulaires d'insectes (Figure 16) (Schneider et Seifert 2010).

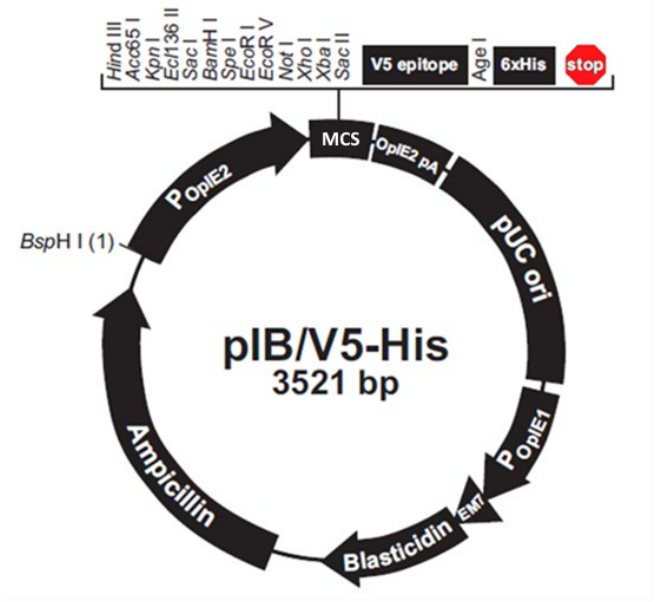

Figure 16 : Carte du plasmide pIB/V5-His. Le plasmide, composé de 3521pb, possède, un promoteur OpIE2, un site de clonage multiple (MCS), les motifs de l'épitope V5 (V5 epitope) et de l'étiquette polyhistidine (6xHis) et les gènes de résistance à la blasticidine (Blasticidin) et à l'ampicilline (Ampicillin). Modifié d'après la documentation du kit pIB/V5-His Vector Kit (Invitrogen™)

3.2. Sous-clonage des séquences des mAChRs dans le vecteur d'expression pIB/V5-His

À partir des plasmides pCR-Blunt recombinés avec la séquence codante des mAChRs, un sous-clonage de la séquence d'intérêt dans le vecteur pIB/V5-His est réalisé à l'aide d'une digestion enzymatique suivie d'une ligation des produits digérés (séquence d'intérêt et vecteur pIB/V5-His). Afin de faciliter ce sous-clonage, deux sites de restriction ont été intégrés dans les séquences des amorces utilisées en PCR pour la production des fragments à insérer dans le plasmide pCR-Blunt (Tableau 3). Ainsi, après l'amplification par PCR, deux sites de restriction sont ajoutés de part et d'autre des séquences nucléotidiques codantes pour les mAChRs. Le premier est situé en amont du codon initiateur et le second en aval du codon-stop. L'extraction des séquences codantes clonées dans le plasmide pCR-Blunt et la linéarisation du vecteur d'expression pIB/V5-His se fera au moyen des enzymes de restriction coupant ces séquences, à savoir EcoRI et XbaI pour le mAChR-A, KpnI et BamHI pour les 2 variants du mAChR-B et KpnI et XbaI pour le mAChR-C. Cela permettra le sous-clonage des séquences codantes pour les mAChRs dans le vecteur d'expression pIB/V5-His. Pour cela, 1µg de chaque plasmide purifié est digéré à 37°C pendant 15 minutes par 1µl d'enzymes de restrictions FastDigest correspondantes (Thermo Scientific) en présence de 2µl de tampon de réaction FastDigest 10X et d'H_2O qsp 20µl. Les enzymes sont ensuite inactivées à 80°C pendant 20 minutes. Après une migration électrophorétique des produits de digestion sur un gel d'agarose à 0,8%, l'insert correspondant à la séquence codante et le plasmide pIB/V5-His linéarisé sont découpés du gel d'agarose puis purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel et PCR clean-up (Macherey Nagel) tel que décrit

précédemment (matériel et méthodes sous partie 2.2.2). La concentration des produits de digestion est déterminée par un dosage spectrophotométrique UV (SimpliNano, Ge Healthcare).

La digestion enzymatique nous permet ainsi d'obtenir un insert correspondant à la séquence codante d'un mAChR et un vecteur pIB/V5-His linéarisé présentant des extrémités compatibles indispensables à leur ligation. Les séquences nucléotidiques obtenues par la digestion enzymatique sont alors insérées dans le vecteur pIB/V5-His linéarisé selon un rapport insert/vecteur de 3 pour 1 (3:1) au moyen de l'enzyme T4 DNA ligase (Invitrogen). Le mélange réactionnel de la ligation est de ce fait composé de 50ng de vecteur pIB/V5-His linéaire, 150ng d'insert, 4µl de tampon de réaction 5X, 1µl d'enzyme T4 DNA Ligase (1U/µl) et d'H_2O (qsp 20µl). La ligation est réalisée à température ambiante durant 4h puis pendant toute la nuit à 4°C.

Les produits de ligation sont transformés dans des bactéries compétentes *E. coli* One Shot® TOP10 sensibles à l'ampicilline (Invitrogen) selon le protocole décrit précédemment (matériel et méthodes sous partie 2.2.4). Puis, les bactéries transformées sont étalées sur des géloses LB-agar contenant l'antibiotique de sélection, l'ampicilline (100µg/ml) et incubées à 37°C toute la nuit. Les colonies bactériennes sont enfin sélectionnées par un criblage par PCR utilisant les amorces pIB, spécifiques du plasmide pIB/V5-His (Tableau 3). Chaque réaction d'amplification est réalisée avec 2µl de suspension bactérienne, 4µl de tampon de réaction de l'ADN polymérase GoTaq® coloré (5X), 0,4µl de dNTP (10mM), 0,1µl d'ADN polymérase GoTaq® (5U/µl, Promega), 1µl d'amorces sens et anti-sens spécifiques du plasmide (10µM ; Tableau 3) et 12,4µl d'H_20 ultra-pure. Les conditions expérimentales de la PCR sont constituées d'une étape de dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, de 35 cycles successifs composés d'une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C, d'une phase d'hybridation de 30 secondes à 50°C, d'une phase d'élongation de 3 minutes à 70°C et d'une étape d'élongation finale de 7 minutes à 70°C. Après une migration électrophorétique des produits de PCR sur un gel d'agarose 0,8%, les clones ayant incorporé le plasmide pIB/V5-His recombiné avec la séquence codante du mAChR souhaité sont mis en culture dans 5ml de milieu LB additionné d'ampicilline (100µg/ml) toute la nuit à 37°C sous agitation (225 rpm). À partir des cultures bactériennes, l'extraction et la purification des plasmides recombinés sont entreprises à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid® (Macherey-Nagel) tel que décrit précédemment (matériel et méthodes sous partie 2.2.5).

Les différents vecteurs d'expression obtenus seront nommés de la façon suivante : « pIB-nom du mAChR ». Exemple : le vecteur pIB-mAChR-A correspond au vecteur pIB/V5-His recombiné avec la séquence codante pour le mAChR-A.

3.3. Culture des cellules *Sf*9 et transfection des cellules avec des vecteurs contenant les séquences des mAChRs

Les cellules *Sf*9 sont cultivées en milieu Sf-900 II SFM (Invitrogen) à 28°C et un passage hebdomadaire est réalisé (500 000 cellules/ml). La numération cellulaire est évaluée par le test d'exclusion au bleu trypan en cellule KovaSlide®. Afin de réaliser une transfection des cellules avec les plasmides pIB/V5-His recombinés avec les séquences codantes des mAChRs, 2ml de cellules *Sf*9 à 300 000 cellules/ml sont mis en culture dans des boîtes de pétri (50mm) pendant 72h à 28°C. Pour les expériences d'imagerie calcique, une lamelle stérile traitée à la poly-D-lysine (0,1mg/ml) est déposée au préalable dans la boîte de pétri pour permettre une meilleure adhésion des cellules. La transfection des plasmides pIB/V5-His recombinés avec les séquences des mAChRs dans les cellules *Sf*9 est effectuée après 72h de culture. Pour ce faire, 1µg d'ADN plasmidique (1µg/µl) est mis en contact avec 4µl d'agent de transfection Escort IV® (Sigma-Aldrich) en présence de 195µl de milieu Sf-900 II SFM

pendant 30 minutes à température ambiante afin de former un complexe plasmide/liposome. Le milieu de culture des cellules est alors remplacé par 800µl de milieu Sf-900 II SFM et le complexe plasmide/liposome (200µl) est déposé. Après 7h d'incubation à 28°C, le milieu de transfection est remplacé par 2ml de milieu Sf-900 II SFM. Les cellules transfectées sont incubées à 28°C durant 96h.

3.4. Établissement de lignées stables contenant le plasmide pIB-mAChR-A ou pIB/V5-His

Une lignée de cellules *Sf*9 exprimant de façon stable le mAChR-A (*Sf*9-mAChR-A) est créée afin de réaliser la co-expression avec l'AChE1 d'*An. gambiae*. Pour cela, des cellules *Sf*9 sont cultivées en boite de pétri (50mm) et transfectées avec le plasmide pIB/V5-His contenant la séquence du mAChR-A (pIB-mAChR-A) selon le protocole détaillé précédemment (matériel et méthodes sous partie 3.3). Puis, 96h après la transfection, le milieu de culture est remplacé par 2ml de milieu Sf-900 II SFM contenant l'antibiotique de sélection, la blasticidine (10µg/ml), et les cellules sont incubées à 28°C. 72h après la sélection, le milieu de sélection est renouvelé et les cellules sont alors décollées à l'aide d'un râteau et transférées en flasque de culture (T25). La lignée exprimant le mAChR-A de façon stable (*Sf*9-mAChR-A) est alors cultivée à 28°C en milieu Sf-900 II SFM-Blasticidine (10µg/ml) et un passage hebdomadaire (500 000 cellules/ml) est réalisé. Après deux passages, la concentration en blasticidine dans le milieu de culture est abaissée à 5µg/ml. En parallèle, une seconde lignée stable (*Sf*9-pIB-vide), contenant le plasmide pIB/V5-His ne comportant pas d'insert dans son site de clonage multiple (pIB-vide) est réalisée selon le même protocole. Cette lignée stable sera utilisée comme lignée témoin dans les expérimentations.

4. Caractérisation pharmacologique et fonctionnelle des mAChRs

4.1. Etude de la variation de calcium cytoplasmique en réponse à l'activation des récepteurs muscariniques par imagerie calcique

4.1.1. Principe de la technique d'imagerie calcique

L'imagerie calcique repose sur l'utilisation de sondes fluorescentes pouvant se lier au calcium. Dans notre étude, nous avons utilisé la sonde Fura-2AM. Cette indication « AM » indique qu'un groupe acétoxyméthylester a été ajouté à la sonde. En effet, la forme non « AM » est chargée négativement ce qui empêche sa pénétration au travers de la membrane. L'ajout d'un groupe acétoxyméthylester permet de masquer cette charge négative et rend la sonde fluorescente lipophile ce qui permet son passage au travers de la membrane cellulaire. Les estérases cytosoliques vont alors cliver la liaison ester et la forme hydrosoluble de la sonde est alors piégée au sein de la cellule (Grienberger et Konnerth 2012).

Le Fura-2AM est une sonde double-excitation mono-émission. Elle est excitée à 380nm dans sa forme libre et à 340nm dans sa forme liée au calcium et émet à 510 nm (Figure 17). La mesure de la fluorescence à la suite d'une alternance des longueurs d'onde de stimulation permet d'établir un ratio entre l'intensité de la fluorescence émise de la sonde libre et de celle de la sonde liée au calcium. L'évolution de ce ratio au cours du temps permet de suivre l'évolution de la $[Ca^{2+}]_i$ de façon semi-quantitative. Dans notre étude, l'alternance des longueurs d'onde d'excitation est produite au moyen d'une lampe à xénon et d'une roue à filtre motorisée situées dans un système d'illumination piloté par un ordinateur. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont séparées au moyen d'un miroir dichroïque localisé dans le microscope. Il permet de réfléchir les longueurs d'onde d'excitation vers l'échantillon, mais possède la propriété de ne pas réfléchir la longueur d'onde d'émission émise par la sonde. Ainsi, une caméra placée derrière ce miroir pourra être en mesure d'enregistrer l'intensité lumineuse émise.

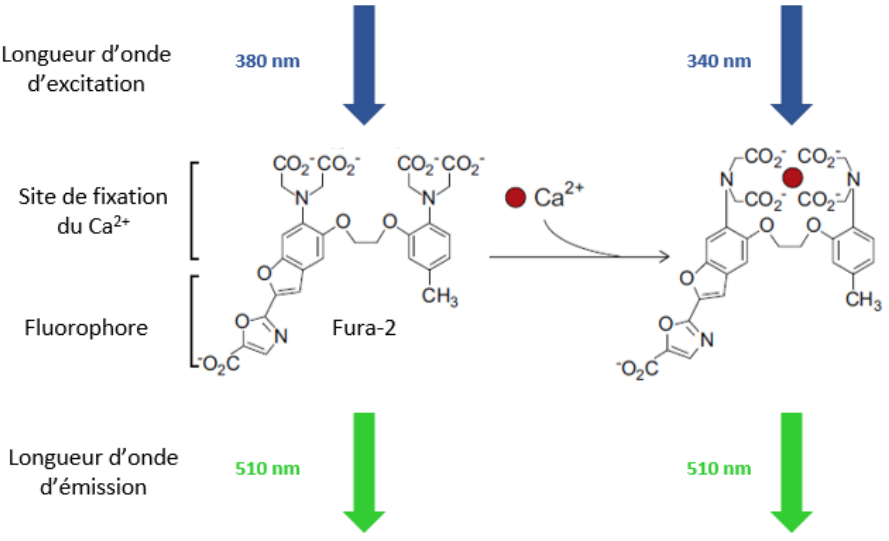

Figure 17 : Structure de la sonde fluorescente Fura-2AM lorsqu'elle est liée ou non au Ca^{2+} et longueurs d'onde d'émission et d'excitation associées. Modifiée d'après Grienberger et Konnerth 2012).

4.1.2. Protocole d'enregistrement de la variation de la concentration en calcium cytoplasmique par imagerie calcique

La solution de superfusion des cellules *Sf*9 utilisée pour les enregistrements calciques est un liquide physiologique (LP) composé de NaCl (131mM), de KCl (4mM), de $CaCl_2$ (2mM), de $MgCl_2$ (2mM) et d'HEPES (10mM) avec un pH ajusté à 7,0. Les cellules *Sf*9 fixées sur la lamelle de verre traitée préalablement avec de la poly-D-lysine sont rincées à deux reprises avec 2ml de LP additionné de glucose (10,5mM). Ensuite, les cellules sont incubées à l'abri de la lumière avec la sonde calcique Fura2-AM (2mM) diluée dans du LP en présence de glucose (10,5mM) et d'acide pluronique (0,05%) pendant 40 minutes à 37°C afin de permettre le passage de la sonde à travers la membrane cellulaire et le clivage cytoplasmique du groupement acétométhylester (AM). Enfin, un rinçage avec du LP additionné de glucose suivi de deux autres rinçages avec du LP sont réalisés. La lamelle est alors déposée avec 1ml de LP dans une chambre d'enregistrement reliée à un système de superfusion automatisé (Warner Instruments). La chambre d'enregistrement est ensuite posée sur la platine d'un microscope inversé à épifluorescence (Nikon Eclipse Ti). Une première observation des cellules est effectuée à l'objectif x20 tandis que les enregistrements sont réalisés à l'objectif x40. Les longueurs d'onde d'excitation du Fura-2AM (340nm et 380nm) sont fournies par un système d'illumination Lambda DG-4 (Sutter Instrument Compagny) comprenant une roue à filtres (Semrock) permettant leur sélection. Une fois excitée, la sonde émet une fluorescence à 510nm que le miroir dichroïque laisse passer jusqu'à la caméra (Hammamatsu orca-R2-C10600) reliée à l'ordinateur (Dell precision 3100) équipé du logiciel Imaging Worbench 6.0 (Indec BioSystems). La fréquence de la prise d'images est d'une image toutes les trois secondes (soit une fréquence de 0,33Hz). Le logiciel permet de visualiser la fluorescence des cellules à 510nm pour chaque longueur d'onde d'excitation, à savoir 340nm et 380nm. Il propose également une image des cellules en termes de ratio entre l'émission à 510nm pour l'excitation 340nm et l'émission à 510nm pour l'excitation 380nm (Ratio 340nm/380nm). Toutes les solutions sont délivrées dans la chambre par le système de superfusion automatisé et sont éliminées par un système d'aspiration.

4.1.3. Caractérisation pharmacologique des mAChRs

L'enregistrement de chaque lame débute par 1 minute de perfusion de LP afin de vérifier que le ratio 340nm/380nm des cellules soit environ de 0,2 qui est la valeur de base pour les cellules *Sf*9. À l'issue de cette vérification, le protocole de superfusion pour les agonistes est le suivant : 60 secondes de solution d'agoniste testé, 600 secondes de LP, puis 60 secondes d'acétylcholine à 10^{-4}M qui est utilisée comme contrôle positif. Le protocole de test diffère légèrement pour les antagonistes ou les modulateurs allostériques. Après la première minute de vérification du ratio 340nm/380nm de base, les différentes solutions sont perfusées dans l'ordre suivant : 180 secondes de solution d'antagoniste ou de modulateur allostérique, 60 secondes de solution d'antagoniste additionnée d'acétylcholine à l'EC_{50} ($3x10^{-7}$M), 400 secondes de solution d'antagoniste ou de modulateur allostérique, 200 secondes de LP et 60 secondes d'acétylcholine à 10^{-4}M qui sert de contrôle positif. Ces protocoles sont appliqués de façon similaire sur les cellules *Sf*9 transfectées et les lignées stables.

4.1.4. Caractérisation de la voie de signalisation couplée aux mAChRs

Le 2-APB, un inhibiteur des récepteurs à l'IP3 (Tocris), le U-73122, un inhibiteur de phospholipase C (Sigma-Aldrich) et le YM-254890, un inhibiteur de protéines $G\alpha_{q/11}$ (Coger) sont préparés dans du DMSO puis dilués dans la solution de charge (LP additionné de Fura-2-AM (2mM), de glucose (10,5mM) et d'acide pluronique (0,05%)). L'enregistrement de chaque lame débute par 1 minute de perfusion de LP afin de constater que le ratio 340nm/380nmdes cellules est environ de 0,2 puis à l'issue de cette vérification de l'acétylcholine 10^{-4}M est perfusée. Afin d'observer l'implication du calcium extracellulaire dans la variation de calcium intracellulaire induite par l'activation du mAChR-A, un LP dépourvu de calcium a été réalisé en replaçant le $CaCl_2$ par du $MgCl_2$ additionné d'un chélateur de calcium : l'EGTA (2mM). Après la première minute de vérification du ratio de base, les différentes solutions sont perfusées dans l'ordre suivant : 180 secondes de LP dépourvu de calcium, 60 secondes de LP dépourvu de calcium additionné d'acétylcholine à 10^{-4}M puis 400 secondes de LP dépourvu de calcium.

4.1.5. Analyse des données

L'ensemble des données brutes est extrait et traité de la façon suivante. Le niveau de base de ratio 340nm/380nm de chaque cellule est déterminé en faisant la moyenne des rapports des 30 premières secondes d'enregistrement. Le ratio 340nm/380nm maximal obtenu après application des agonistes est extrait des données brutes avec le logiciel GraphPad Prism (version 8.00, GraphPad Software). La variation de ratio 340nm/380nm est obtenue par la différence entre le ratio 340nm/380nm du niveau basal de la cellule moyenné sur 30 secondes et le ratio 340nm/380nm maximal induit par l'application de l'agoniste. Les résultats obtenus sont exprimés sous forme d'histogramme en moyenne ± S.E.M.

5. Étude de l'impact de l'activation du mAChR-A sur la sensibilité de l'AChE1 à un organophosphoré.

5.1. Co-expression du mAChR-A et de l'AChE1 en système hétérologue

Afin d'étudier l'effet de l'activation du mAChR-A sur la modulation de la sensibilité de l'AChE1 à l'organophosphoré chlorpyriphos-éthyl, l'AChE1 est exprimée dans les lignées stables *Sf*9-mAChR-A et *Sf*9-pIB-vide suite à la transfection du plasmide pIB/V5-His-*ace*1, contenant la séquence codante de l'acétylcholinestérase de type 1 d'*An. gambiae* (KC_631949) (Licznar *et al.* 2014), disponible au laboratoire. Pour cela, des cellules *Sf*9-mAChR-A et *Sf*9-pIB-vide (600 000 cellules) sont cultivées en boite de pétri (50mm) et la transfection du plasmide pIB/V5-His-*ace*1 est réalisée selon le protocole précédemment décrit (matériel et méthodes sous partie 3.3). Les cellules transfectées sont incubées à 28°C pendant 96h.

5.2. Dosage de l'activité de l'AChE selon la méthode d'Ellman

La méthode d'Ellman permet de mesurer l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase. Cette méthode est très sensible et peut être appliquée à de faibles quantités de tissus. Elle utilise l' acétylthiocholine (AtCh), un analogue de l'acétylcholine comme substrat pour l'enzyme. L'AChE dégrade l'AtCh en acétate et en thiocoline, et cette dernière réagit au niveau de son groupement thiol avec du 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoate (DTNB) appelé aussi réactif d'Ellman. Le produit de cette réaction est un composé anionique de couleur jaune : l'acide 5-thio-2-nitro-benzoic, dont l'absorbance est de 405nm (Figure 18) (Ellman *et al.* 1961).

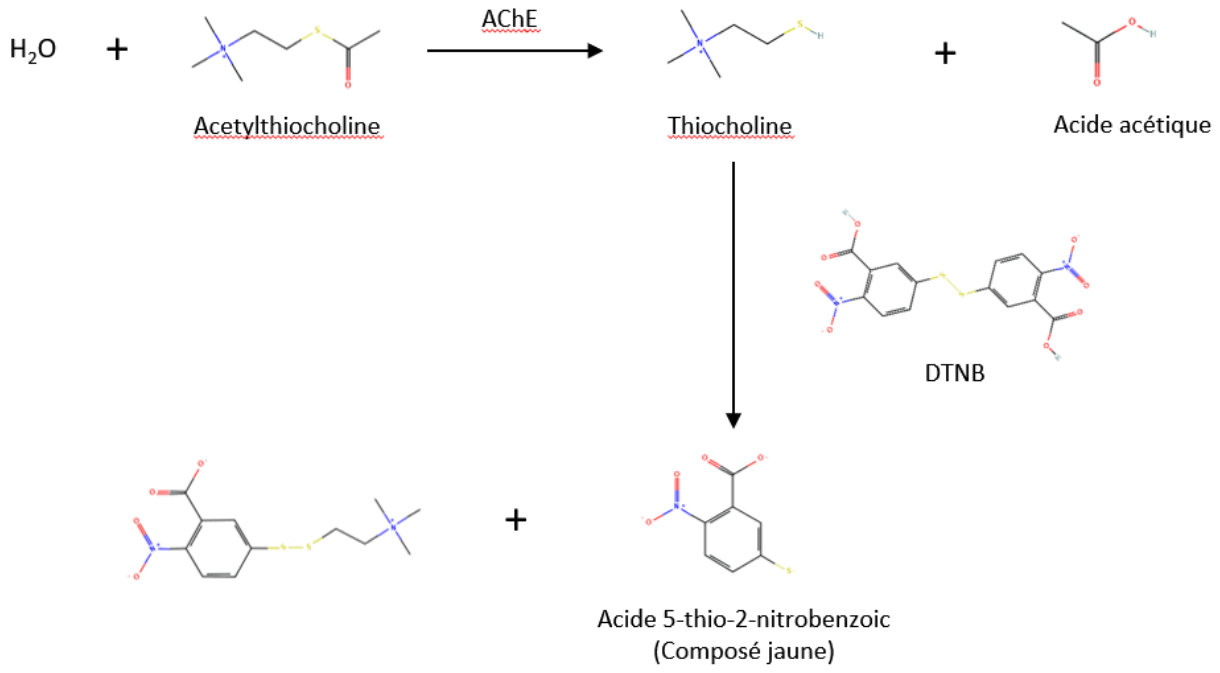

Figure 18 : Schéma représentant les réactions chimiques ayant lieu lors d'un dosage de l'activité de l'AChE par la méthode d'Ellman.

Le milieu des différentes cultures des cellules des lignées stables (*Sf*9-mAChR-A et *Sf*9-pIB-vide) transfectées ou non avec le plasmide pIB/V5-His-*ace*1 est remplacé par 2ml de Sf900 II SFM. Les cellules sont alors mises en suspension, puis la numération cellulaire est évaluée par le test d'exclusion au bleu trypan en cellule KovaSlide®. Une suspension homogène à 500 000 cellules/ml est réalisée. En parallèle, des dilutions en cascade de l'insecticide inhibiteur de l'AChE (10^{-3}M à $5x10^{-8}$M) sont réalisées dans du PBS composé de NaCl (137mM), de KCl (2,7mM), Na_2HPO_4 (10mM) et de KH_2PO_4 (1,76mM) avec un pH ajusté à 7,4. Dans une plaque 96 puits, 10µl de solution d'insecticide ou de PBS, 10µl de LP et 80 µl de suspension de cellules (500 000 cellules/ml) sont déposés en triplicata. Les cellules sont alors incubées 30 minutes à température ambiante, puis 100µl d'AtCh (1mM) et 100µl de DTNB sont ajoutés dans chaque puits. Sachant que l'AtCh est un analogue de l'ACh, il est utilisé comme substrat de l'AChE pour la mesure de l'activité acétylcholinestérasique mais aussi comme un agoniste des mAChR-A exprimés dans la lignée *Sf*9-mAChR-A. Les cellules sont enfin incubées 120 minutes à l'abri de la lumière puis la plaque est placée dans un spectrophotomètre à microplaques (Multiskan GO, Thermo Fischer) et l'absorbance à 405nm est alors mesurée.

L'ensemble des données brutes pour chaque lignée stable (*Sf*9-mAChR-A et *Sf*9-pIB-vide) est traité de la façon suivante : La moyenne des triplicatas des cellules non transfectées avec le plasmide pIB/V5-His-ace1 (bruit de fond) est soustraite de la moyenne des triplicatas obtenue pour chaque concentration d'insecticide, puis les valeurs sont normalisées par rapport au triplicata des cellules transfectées avec le plasmide pIB/V5-His-ace1 sans insecticide (activité maximale). L'activité résiduelle de l'AChE est exprimée en pourcentage. Les courbes effet-concentration sont obtenues à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 8.00, GraphPad Software) et sont analysées selon une régression non linéaire permettant d'évaluer la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}).

Résultats

1. Identification, analyse et clonage des séquences des récepteurs muscariniques d'anophèles.

1.1. Identification des mAChRs dans le protéome d'*An. gambiae* et analyse des séquences prédites

À l'heure actuelle, peu de récepteurs muscariniques d'insecte ont été caractérisés d'un point de vue moléculaire. Le séquençage, ainsi que l'analyse bio-informatique du génome d'*Anopheles gambiae* a permis d'identifier de nombreuses séquences codantes. Cependant, peu d'informations sont disponibles quant aux protéines correspondantes à ces séquences. Chez la drosophile *D. melanogaster*, trois types de récepteurs muscariniques ont été mis en évidence. Ils sont nommés respectivement mAChR-A, mAChR-B et mAChR-C. Le récepteur mAChR-A présente 2 variants qui diffèrent l'un de l'autre par 17 acides aminés dans la troisième boucle intracellulaire. Le récepteur mAChR-B présente aussi deux isoformes qui varient de 264 acides aminés situés également dans la troisième boucle intracellulaire. Le récepteur mAChR-C ne présente quant à lui qu'un seul variant. Ces séquences sont comparées individuellement avec celles de la base de données non redondante d'*Anopheles gambiae* au moyen du logiciel BLASTp afin d'en identifier les orthologues. Comme chez la drosophile, un récepteur mAChR-C et deux récepteurs mAChR-B (mAChR-B1 et mAChR-B2) ont été trouvés chez *An. gambiae*. En ce qui concerne le récepteur mAChR-A, un seul variant a été mis en évidence (Tableau 5).

Type	Variant	Séquence protéique *D. melanogaster*	Séquence protéique *An. gambiae*	Homologie et score (Blastp)	Séquence nucléotidique *An. gambiae*
A	1	NP_726440.1	XP_314486.1	Identité : 63% Score : 835	XM_314486.3
	2	NP_523844.2		Identité : 62% Score : 825	
B	1	NP_649764.1	XP_003436890.1	Identité : 63% Score : 471	XM_003436842.1
	2	NP_001287221.1	XP_313548.1	Identité : 63% Score 440	XM_313548.1
C		NP_572358.1	XP_310742.3	Identité : 56% Score 334	XM_310742.3

Tableau 5 : Tableau récapitulatif indiquant le nombre de variants pour chaque type de récepteurs mAChRs d'anophèles, les N° d'accession des séquences protéiques et nucléotidiques prédites chez le moustique *An. gambiae* suite à un BLASTp réalisé avec les séquences protéiques de la drosophile *D. melanogaster*. Le pourcentage d'homologie des séquences protéiques d'*An. gambiae* avec celles de la drosophile est indiqué.

Pour chacune des séquences identifiées chez l'anophèle, la prédiction des sept segments transmembranaires et du pont disulfure entre les boucles extracellulaires 1 et 2 a permis de confirmer que ces séquences codent pour des RCPG (Figure 19).

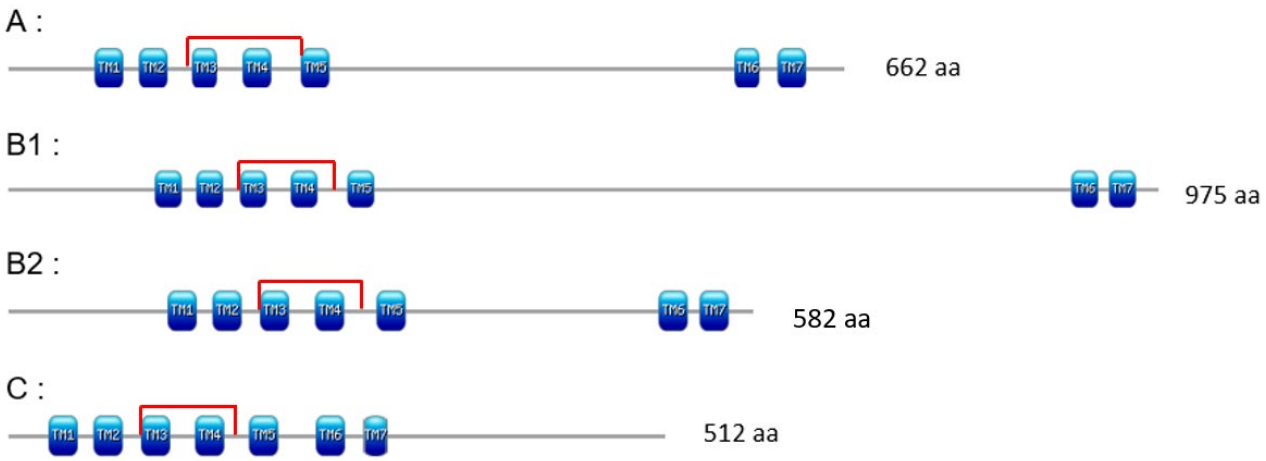

Figure 19 : Schéma de la structure des récepteurs mAChRs *d'An. gambiae* prédite en bio-informatique. Les sept segments transmembranaires (TM1 à TM7) sont représentés en bleu, le pont disulfure positionné entre les boucles extracellulaires 1 et 2 est indiqué en rouge et la séquence protéique est représentée en gris à l'échelle selon la longueur de chaque séquence. (Logiciel : Mise en forme : Prosite MyDomains ; prédiction des TMs : TMHMM, prédiction du pont dissulfure : ScanProsite).

1.2. Analyse de la séquence clonée du récepteur mAChR-A d'*An. gambiae*

La séquence codante du récepteur mAChR-A a été amplifié par PCR haute-fidélité, insérée dans le vecteur de clonage pCR-Blunt puis séquencée. La séquence nucléotidique du récepteur mAChR-A contient 1989 paires de bases et diffère de la séquence prédite de 4 nucléotides induisant 4 mutations silencieuses. Cette séquence code pour une protéine d'une longueur de 662 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 74.08kDa et un point isoélectrique de 9,17. L'analyse de la séquence du récepteur mAChR-A a permis de mettre en évidence des résidus connus pour être impliqués dans une séquence consensus nécessaire au couplage des protéines $G\alpha_{q/11}$ ce qui suggère que ces récepteurs sont couplés à la voie de signalisation des phosphoinositides (Burstein *et al.* 1995, 1996, 1998; Hill-Eubanks *et al.* 1996; Ren *et al.* 2015). L'identification dans cette séquence des résidus impliqués dans le site de fixation de l'ACh ainsi que des acides aminés conservés dans la séquence des récepteurs mAChRs suggèrent que ce RCPG est un récepteur cholinergique de type muscarinique (Figure 20).

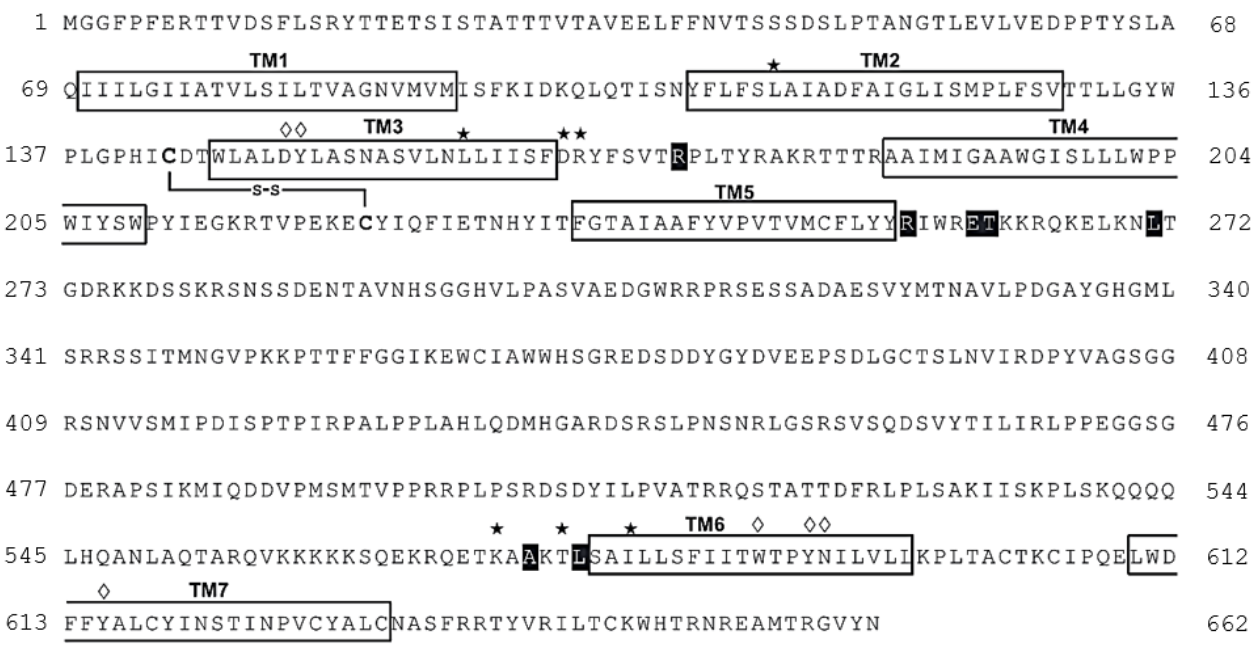

Figure 20 : Analyse de la séquence protéique du mAChR-A d'*An. gambiae* traduite à partir de la séquence nucléotidique clonée dans le plasmide pCR-Blunt. Les sept segments transmembranaires (TM) prédits avec le logiciel TMHMM sont encadrés et indiqués de TM1 à TM7. Le pont disulfure, établi entre les deux résidus cystéine, en gras, localisés dans la première et la deuxième boucle extracellulaire, est représenté par deux S interconnectés (S-S). Les six résidus marqués d'un losange correspondent au site de fixation de l'acétylcholine (Haga *et al.* 2012; Xia *et al.* 2016). Les acides aminés conservés dans la séquence de tous les récepteurs mAChRs sont indiqués par les étoiles (Ren *et al.* 2015; Xia *et al.* 2016). Les acides aminés impliqués dans le couplage de la protéine $G\alpha_{q/11}$ sont surlignés en noir (Ren *et al.* 2015).

De plus chez la drosophile, la comparaison des deux isoformes du récepteur mAChR-A montre une délétion de 17 acides aminés sur la troisième boucle intracellulaire (Collin *et al.* 2013). La même délétion a été trouvée dans la séquence du récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* (Figure 21).

```
An.g_mAChR-A              379  DYGYDVEEPSDLG-----------------CTSLNVIRDPY  402
Dm_mAChR-A_isoform A      414  DFAYEQEEPSDLG-----------------CTSMNVMRDNY  437
Dm_mAChR-A_isoform B      414  DFAYEQEEPSDLGYATPVTIETPLQSSVSRCTSMNVMRDNY  454
```

Figure 21 : Alignement de la région spécifique des séquences protéiques du récepteur mAChR-A de *D. melanogaster* permettant la distinction entre l'isoforme A (Dm_mAChR-A_isoform A; NP_726440.1), et l'isoforme B (Dm-mAChR-B_isoform B; NP_523844.2) avec celle du récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* (An.g_mAChR-A; XP_314486.1).

1.3. Analyse des séquences clonées du récepteur mAChR-B d'*An. gambiae*

Comme chez la drosophile, deux isoformes ont été prédites pour le récepteur mAChR de type B. Il s'agit des récepteurs mAChR-B1 et mAChR-B2. Aucun insert n'a pu être produit par PCR pour le récepteur mAChR-B2 suggérant que celui-ci n'est pas exprimé dans les cellules nerveuses provenant de la tête des moustiques. La séquence codante pour le récepteur mAChR-B1 a été insérée dans le vecteur de clonage pCR-Blunt. Deux clones, issus du même clonage, contenant le plasmide recombiné ont été envoyés au séquençage. Les analyses des séquences nucléotidiques nous montrent la présence de 6 mutations ponctuelles dans les 2 clones. Parmi ces mutations, 3 sont silencieuses et les 3 autres conduisent à la substitution de nucléotides induisant une mutation de la séquence protéique. La première mutation, F98I, se situe sur la partie N-terminale extracellulaire du récepteur, la seconde mutation, L242I, se situe dans le quatrième segment transmembranaire et la troisième mutation, V370L, dans la troisième boucle intracellulaire. Un alignement de cette séquence protéique avec la séquence du récepteur mAChR-B de différents insectes montre que la séquence protéique du récepteur mAChR-B d'*Apis mellifera* (N° Accession : XP_006558421.1) ainsi que les deux isoformes du récepteur mAChR-B de *D. melanogaster* (Tableau 5) présentent également une isoleucine (I) à la place d'une lysine (L) (mutation L242I entre la séquence prédite et la séquence clonée d'*An. gambiae*). Concernant les autres mutations, aucun des acides aminés présents chez *An. gambiae*, que ce soit dans la séquence clonée ou la séquence prédite, ne correspondent à ceux présents chez *A. mellifera* ou *D. melanogaster*. Cette séquence de 2928 paires de bases code pour une protéine d'une longueur de 975 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 108,54kDa et un point isoélectrique de 7,02. L'analyse de la séquence du récepteur mAChR-B1 a permis de mettre en évidence deux résidus connus pour être impliqués dans une séquence consensus nécessaire au couplage des protéines $G\alpha_{i/o}$ ce qui suggère que l'activation de ces récepteurs entraine une inhibition de l'adénylate cyclase (Ren *et al.* 2015). Dans cette séquence, des acides aminés conservés chez les mAChRs ont été identifiés. Ces données suggèrent que la séquence clonée code pour un RCPG et plus particulièrement un récepteur cholinergique de type muscarinique (Figure 22).

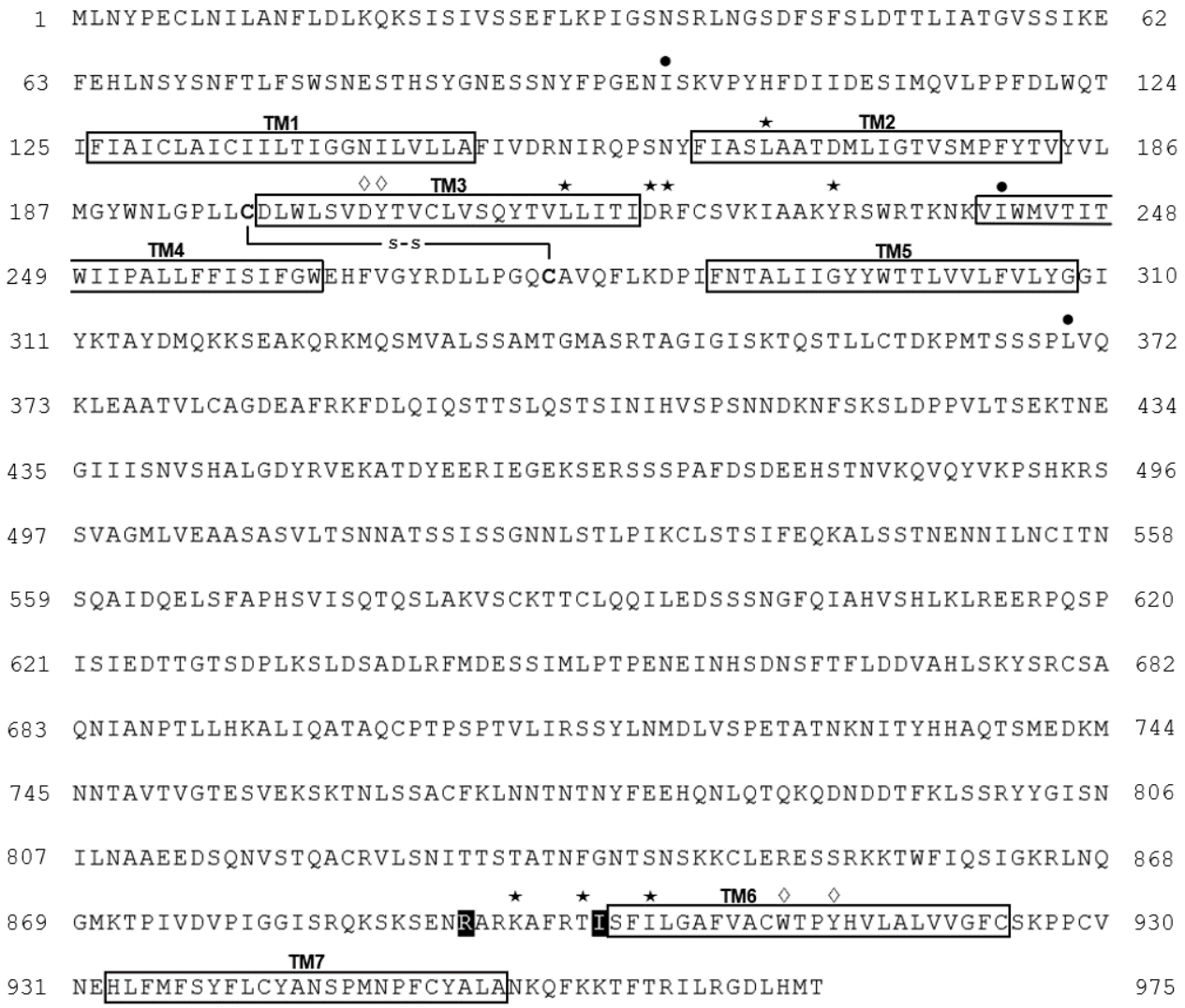

Figure 22 : Analyse de la séquence protéique du récepteur mAChR-B1 d'*An. gambiae* traduite à partir de la séquence nucléotidique clonée dans le plasmide pCR-Blunt. Les sept segments transmembranaires (TM) prédits avec le logiciel TMHMM sont encadrés et indiqués de TM1 à TM7. Le pont disulfure établi entre les deux résidus cystéine, en gras, localisés dans la première et la deuxième boucle extracellulaire, est représenté par deux S interconnectés (S-S). Les mutations non silencieuses identifiées par rapport à la séquence prédite sont indiquées par un rond noir. Les résidus marqués d'un losange correspondent au site fixation de l'acétylcholine (Haga *et al.* 2012; Xia *et al.* 2016). Les acides aminés conservés dans la séquence de tous les récepteurs mAChRs sont indiqués par les étoiles (Ren *et al.* 2015; Xia *et al.* 2016). Les acides aminés impliqués dans le couplage de la protéine $G\alpha_{i/o}$ sont surlignés en noir (Ren *et al.* 2015).

1.4. Analyse de la séquence clonée du récepteur mAChR-C d'*An. gambiae*

La séquence du récepteur mAChR-C a également été clonée et insérée dans pCR-Blunt. Cette séquence, d'une longueur de 1539 paires de bases, diffère de la séquence prédite de 3 nucléotides induisant 3 mutations silencieuses. La séquence du mAChR-C code pour une protéine de 512 acides aminés, qui présente un poids moléculaire prédit de 56,32kDa et un point isoélectrique de 6,98. L'analyse de la séquence de ce récepteur a permis de mettre en évidence 2 des 7 acides aminés impliqués dans le couplage de la protéine $G\alpha_{q/11}$ (Ren *et al.* 2015). Ces deux acides aminés sont également les seuls présents dans la séquence du mAChR-C de drosophile (Xia *et al.* 2016). Des résidus conservés dans tous les mAChRs ainsi que ceux impliqués dans le site de fixation de l'ACh sont présents dans la séquence, ce qui laisse supposer qu'il s'agisse bien d'un récepteur muscarinique (Figure 23).

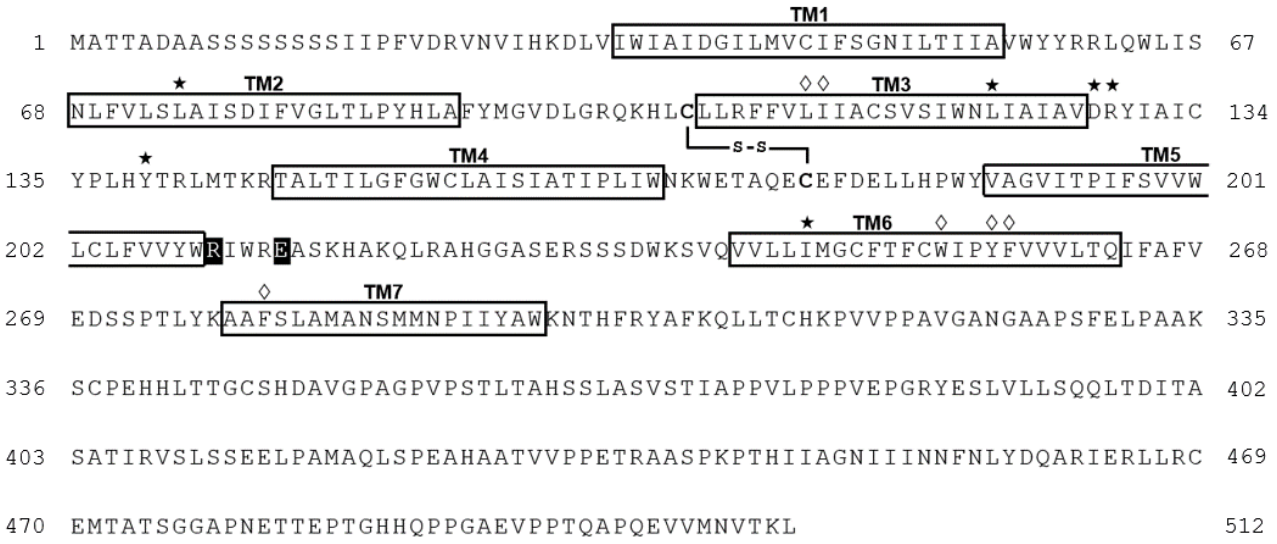

Figure 23 : Analyse de la séquence protéique du récepteur mAChR-C d'*An. gambiae* traduite à partir de la séquence nucléotidique clonée dans le plasmide pCR-Blunt. Les sept segments transmembranaires (TM) prédits avec le logiciel TMHMM sont encadrés et indiqués de TM1 à TM7. Le pont disulfure établi entre les deux résidus cystéine, en gras, localisés dans la première et la deuxième boucle extracellulaire, est représenté par deux S interconnectés (S-S). Les résidus marqués d'un losange correspondent au site de fixation de l'acétylcholine (Haga *et al.* 2012; Xia *et al.* 2016). Les acides aminés conservés dans la séquence de tous les récepteurs mAChRs sont indiqués par les étoiles (Ren *et al.* 2015; Xia *et al.* 2016). Les acides aminés impliqués dans les couplages de la protéine $G\alpha_{q/11}$ sont surlignés en noir (Ren *et al.* 2015; Xia *et al.* 2016).

2. Analyse de l'expression des transcrits des mAChRs dans les cellules nerveuses

À la suite de l'identification des séquences codantes des différents mAChRs, nous avons cherché à déterminer lesquels sont exprimés dans le système nerveux du moustique *An. gambiae*. La quantification des transcrits mAChR-A, mAChR-B1, mAChR-B2 et mAChR-C a été réalisée par PCR quantitative sur des ADNc issus de suspensions neuronales de larves, d'imagos mâles et d'imagos femelles. L'analyse de l'expression de ces récepteurs a montré que les transcrits mAChR-A et mAChR-B1 sont majoritairement exprimés quel que soit le stade de développement (larves, imago) alors que les transcrits mAChR-C sont plus exprimés au stade larvaire qu'au stade imago. Le récepteur mAChR-B2 ne semble pas ou trop peu exprimé pour être détectable dans le système nerveux du moustique *An. gambiae* (Figure 24).

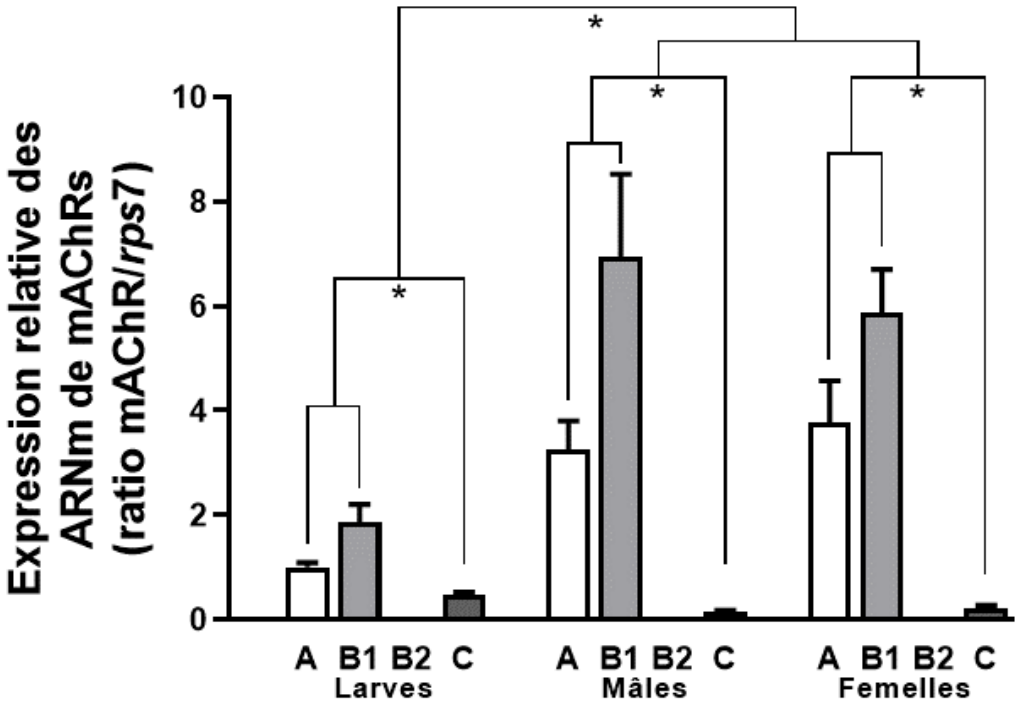

Figure 24 : Quantification par qPCR des transcrits codant pour les mAChRs d'*An. gambiae* (mAChR-A : A ; mAChR-B1 : B1 ; mAChR-B2 : B2 ; mAChR-C : C). L'expression est normalisée avec le gène de référence *rps7* selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (n=4 à 5). *p<0,05, (Test de Mann-Whitney).

3. Étude pharmacologique et fonctionnelle des récepteurs muscariniques de type A et de type C

Chez la drosophile, les récepteurs mAChR-A et mAChR-C sont liés à une augmentation du calcium intracellulaire. De plus, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ *via* les récepteurs mAChRs permet d'augmenter la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides. Ces récepteurs étant exprimés dans le système nerveux de l'anophèle, nous nous sommes donc concentrés sur la caractérisation pharmacologique de ces deux mAChRs.

3.1. Expression fonctionnelle des récepteurs mAChR-A et mAChR-C dans des cellules *Sf*9

Les séquences codantes du récepteur mAChR-A et du récepteur mAChR-C ont été sous clonées dans le vecteur plasmidique pIB/V5-His. Les vecteurs ayant inséré ces séquences codantes sont nommés respectivement pIB-mAChR-A et pIB-mAChR-C. Afin de réaliser la caractérisation pharmacologique de ces récepteurs, ils ont été exprimés dans les cellules *Sf*9. Grâce à la technique d'imagerie calcique, nous avons pu montrer que le récepteur mAChR-A exprimé dans les cellules *Sf*9 est fonctionnel. En effet, l'application d'acétylcholine (10^{-4}M), qui est le ligand endogène des récepteurs cholinergiques, augmente de 0,25 fois le ratio 340nm/380nm ce qui reflète une augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique alors que pour le vecteur d'expression pIB/V5-His sans insert, l'ACh n'induit aucune variation de fluorescence (n=37 à 40 cellules issues de 3 à 4 transfections) (Figure 25). L'ensemble de ces résultats nous permet de confirmer que la séquence clonée du mAChR-A code bien pour un récepteur de type cholinergique fonctionnel.

À l'inverse, l'application d'acétylcholine à forte concentration (10^{-4}M) n'a pas été en mesure d'entrainer une hausse du calcium intracellulaire dans les cellules transfectées avec pIB-mAChR-C.

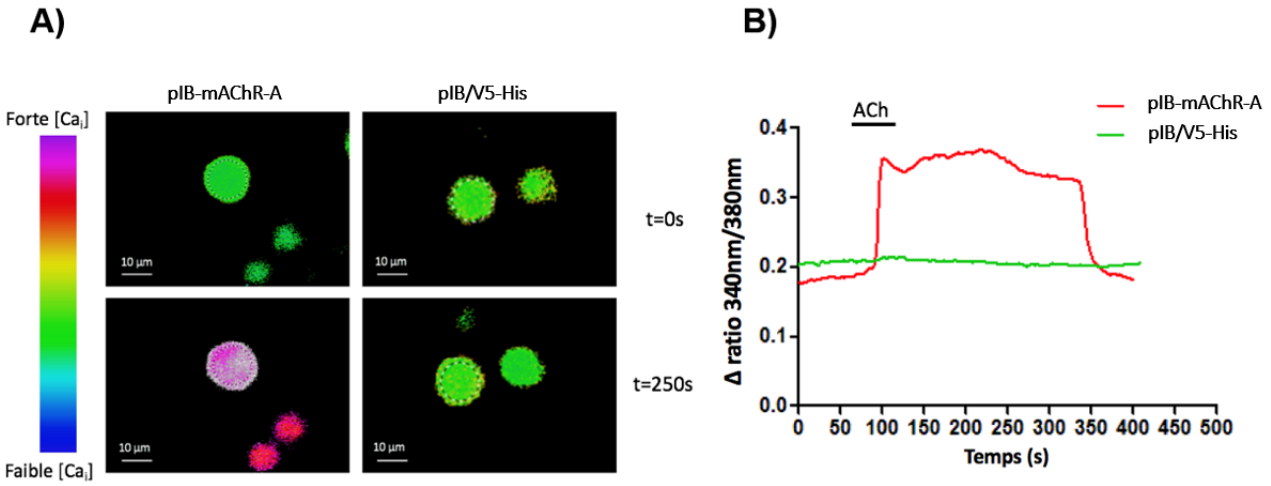

Figure 25 : Analyse des variations de la concentration en calcium intracellulaire dans les cellules *Sf*9 transfectées avec le vecteur pIB-mAChR-A ou pIB/V5-His au cours du temps. (A) Photo de cellules en imagerie calcique avant (t=0s) et après activation du mAChR-A (t=250s). (B) Tracés représentant la variation du ratio 340nm/380nm en fonction du temps après une application d'ACh à 10^{-4}M.

3.2. Pharmacologie du récepteur muscarinique mAChR-A

Le récepteur mAChR-A étant fonctionnel lors de son expression dans les cellules *Sf*9, l'étude de sa pharmacologie a été entreprise au moyen de la technique d'imagerie calcique. Dans un premier temps, diverses amines biogènes (sérotonine, tyramine, dopamine) et le glutamate ont été testés sur les cellules *Sf*9 exprimant le récepteur mAChR-A afin de confirmer que ce récepteur est bien de type cholinergique. Seule l'application d'acétylcholine est en mesure d'induire une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (n=26 à 37 cellules issues de 3 transfections). En effet, l'application de sérotonine (10^{-4}M) n'entraine pas de variation du niveau de calcium, de même que le glutamate et les autres amines biogènes (Figure 26A). Des résultats similaires ont été montrés pour l'application d'une plus faible concentration de ces molécules (10^{-7}M). Ces résultats confirment que le mAChR-A d'anophèle est un récepteur cholinergique. De plus, l'application de nicotine à 10^{-7}M et à 10^{-4}M n'induit pas de réponse calcique (n=23 à 54 cellules issues de 3 transfections) (Figure 26B). Cela suggère que ce récepteur cholinergique est de type muscarinique.

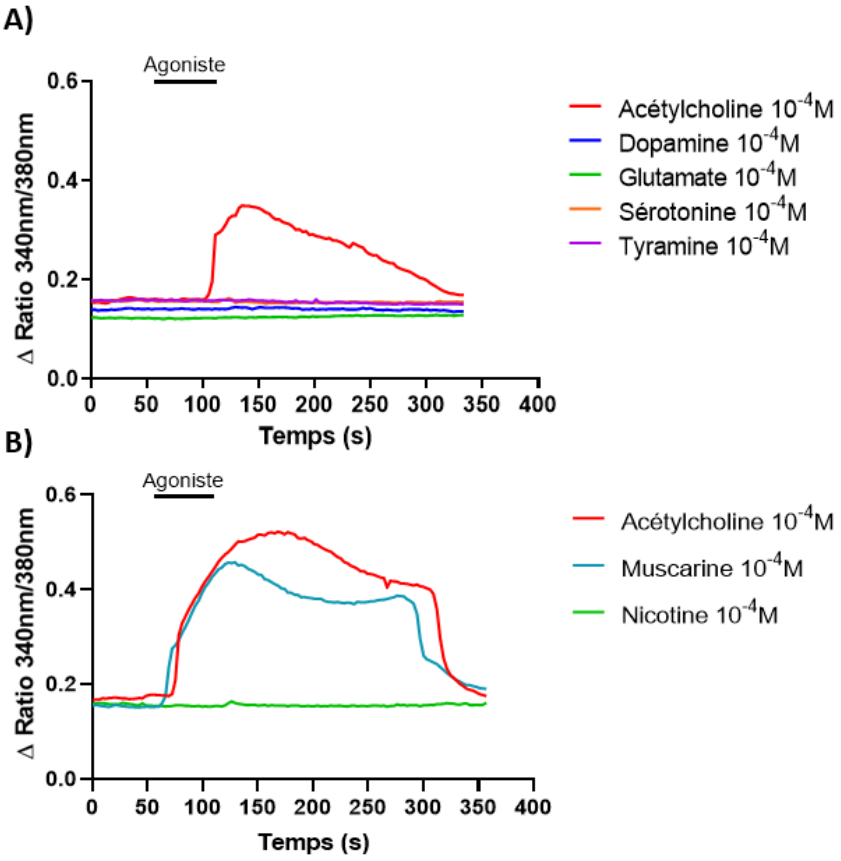

Figure 26 : Exemples de tracés représentant la variation du ratio 340nm/380nm au cours du temps après l'application de diverses molécules à la concentration de 10^{-4}M. (A) Comparaison de l'effet d'une application d'acétylcholine, de dopamine, de glutamate, de sérotonine ou de tyramine sur les mAChR-A. (B) Comparaison de l'effet de l'application de nicotine, de muscarine et d'acétylcholine sur les récepteurs mAChR-A.

L'étude des agonistes du récepteur mAChR-A a été approfondie pour trois d'entre eux : l'acétylcholine, la muscarine et l'oxotrémorine M. Pour cela, les courbes concentration-effet pour l'acétylcholine, la muscarine, ainsi qu'un troisième agoniste des mAChRs l'oxotrémorine M, ont été obtenues par l'application de doses croissantes (10^{-9}M à 10^{-4}M) de ces agonistes sur les cellules *Sf*9 exprimant le récepteur mAChR-A (Figure 27).

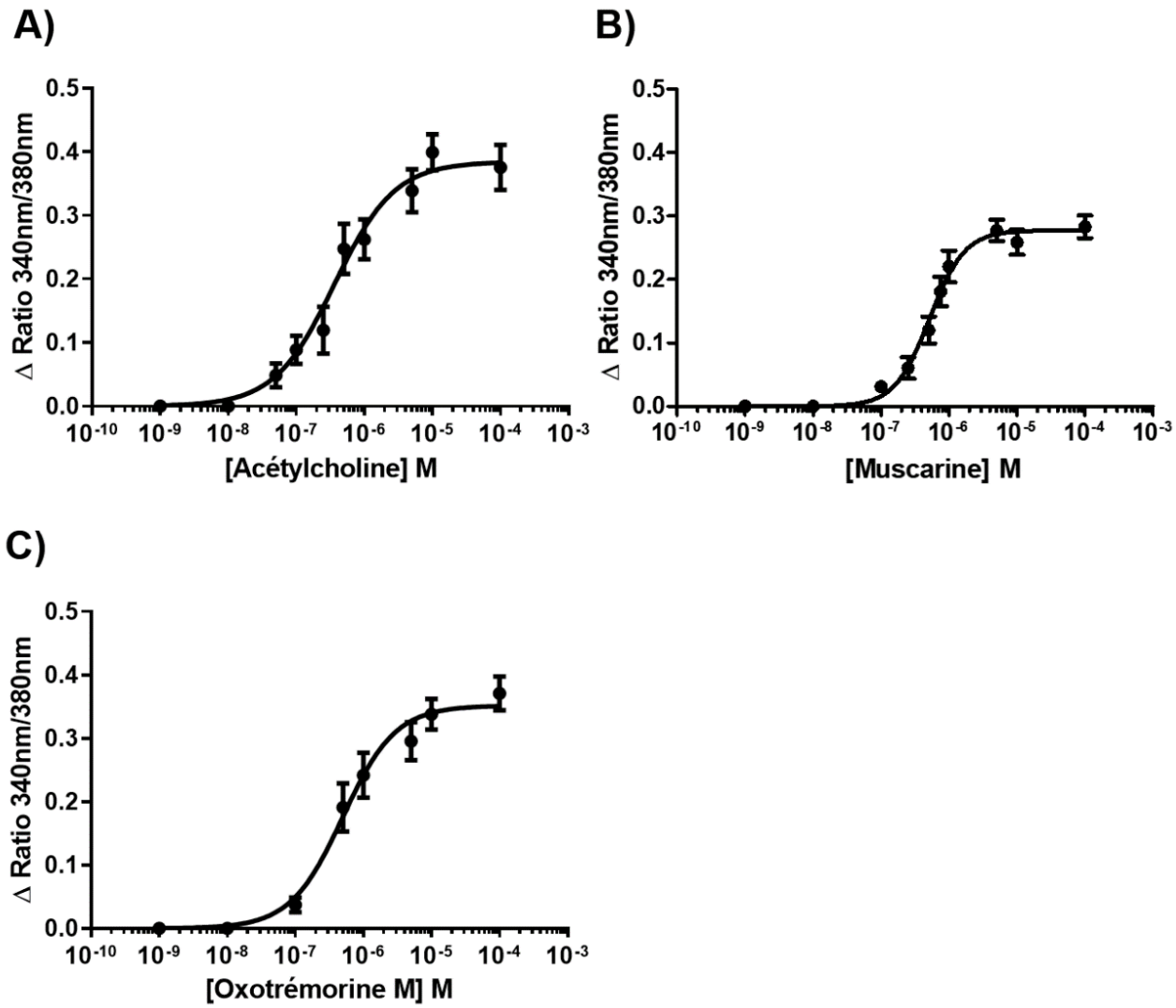

Figure 27 : Courbes concentration-effet obtenues suite à l'application d'acétylcholine (A), de muscarine (B) ou d'oxotrémorine M (C) sur le récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* exprimé dans des cellules *Sf*9 (n=14 à 70 cellules issues de 3 à 5 transfections pour chaque concentration).

La relation entre la concentration d'agoniste et la variation du ratio 340nm/380nm permet de déterminer l'effet maximal (Emax), l'EC_{50} qui correspond à la concentration induisant la moitié de l'effet maximal, ainsi que le coefficient de Hill (nH) pour chaque agoniste (Tableau 6).

	Acétylcholine	Muscarine	Oxotrémorine M
EC_{50} (x 10^{-7} M)	3,65 ± 1,27	5,19 ± 1,11	4,98 ± 1,24
Emax	0,38 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,35 ± 0,02
nH	0,99 ± 0,21	1,69 ± 0,30	1,12 ± 0,25

Tableau 6 : Tableau récapitulatif de l'effet maximal (Emax), du coefficient de Hill (nH) et de l'EC_{50} pour chaque agoniste testé sur le mAChR-A d'anophèle.

La comparaison des EC_{50} indique la sensibilité du récepteur mAChR-A pour la muscarine, l'oxotrémorine M et l'acétylcholine. Bien que le récepteur mAChR-A soit activé par ces trois agonistes, aucune différence significative de la sensibilité du récepteur mAChR-A n'est observable pour ces trois agonistes. Cependant, l'efficacité maximale de la muscarine est plus faible que celle des deux autres molécules. En effet, à une concentration à laquelle l'oxotrémorine M et la muscarine induisent une réponse maximale, l'oxotrémorine M n'entraine que 91,50 ± 4,99% de la réponse maximale induite par l'ACh et la muscarine 72,15 ± 2,92% de la réponse maximale induite par l'ACh. Ainsi, l'ACh et l'oxotrémorine M présentent une plus grande efficacité que la muscarine sur le récepteur mAChR-A. L'ACh induisant la plus grande variation de la $[Ca^{2+}]_i$, cet agoniste sera utilisé pour évaluer les effets des antagonistes des mAChRs sur le récepteur mAChR-A.

Afin de confirmer que ce récepteur est bien un récepteur muscarinique, l'effet d'un antagoniste spécifique des mAChRs, l'atropine, a été observé sur l'activation du récepteur mAChR-A. Ainsi, nous avons montré que l'application d'atropine à une concentration allant de 10^{-9}M à 10^{-7}M inhibe l'effet de l'acétylcholine appliquée à l'EC_{50} ($3x10^{-7}$M) et que cette inhibition dépend de la concentration d'atropine utilisée (Figure 28).

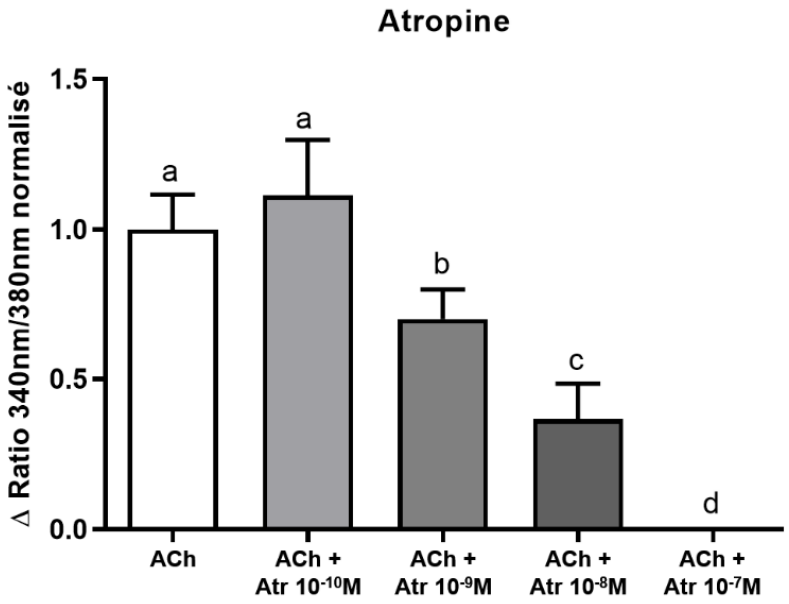

Figure 28 : Effet de l'atropine (Atr) sur l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'application d'ACh sur des cellules *Sf*9 exprimant le récepteur mAChR-A. Le Δ ratio 340nm/380nm est déterminé à la suite de l'application d'ACh ($3x10^{-7}$M) en présence d'atropine (10^{-10}M à 10^{-7}M) et normalisé au Δ ratio 340nm/380nm après l'application d'ACh seule ($3x10^{-7}$M). Les lettres différentes au-dessus des barres indiquent les différences significatives entre les concentrations d'atropine et les barres annotées avec la même lettre ne présentent pas de différence significative selon un test de Mann-Withney ($p<0,05$; n=41 à 104 cellules issues de 3 à 5 transfections).

Nous avons ensuite approfondi la pharmacologie du récepteur mAChR-A par l'utilisation d'antagonistes sélectifs pour les différents types de mAChRs connus chez les vertébrés. En nous basant sur la pharmacologie des récepteurs de mammifères, nous avons étudié les effets de la pirenzépine, de l'AF-DX 116, du 4-DAMP et du tropicamide qui sont respectivement des antagonistes sélectifs pour les récepteurs muscariniques M1, M2, M3 et M4 chez les mammifères (Caulfield 1993; Caulfield et Birdsall 1998; Ishii et Kurachi 2006).

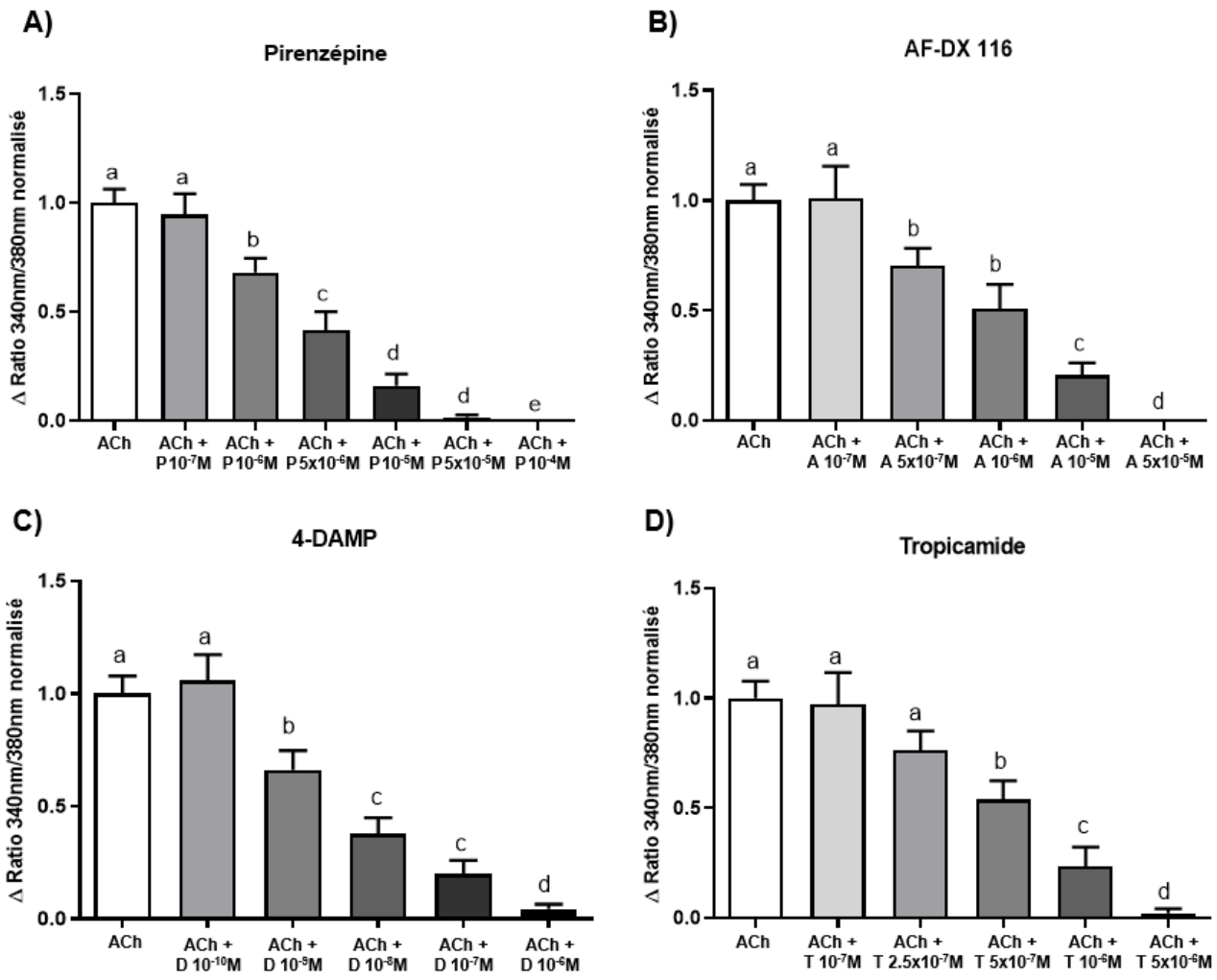

Figure 29 : Effet de divers antagonistes sélectifs des mAChRs sur l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'application d'ACh sur des cellules *Sf*9 exprimant le récepteur mAChR-A. Le Δ ratio 340nm/380nm est déterminé à la suite de l'application d'ACh ($3x10^{-7}$M) en présence de (A) Pirenzépine, (B) AF-DX 116, (C) 4-DAMP et (D) Tropicamide, et normalisé au Δ ratio 340nm/380nm après l'application d'ACh seule ($3x10^{-7}$M). Au sein de chaque histograme, les lettres différentes au-dessus des barres indiquent les différences significatives entre les concentrations d'antagoniste et les barres annotées avec la même lettre ne présentent pas de différence significative selon un test de Mann-Withney ($p<0,05$; n=31 à 202 cellules issues de 3 à 5 transfections).

La pirenzépine, l'AF-DX 116, le 4-DAMP et le tropicamide bloquent la réponse du récepteur mAChR-A à l'ACh ($3x10^{-7}$M). De plus, cette inhibition est dépendante de la concentration d'antagoniste testée. Cependant, si l'on compare l'effet de ces antagonistes, l'application de 4-DAMP à 10^{-6}M bloque presque complètement (95,72 ± 2,09%) la réponse induite par l'ACh alors qu'à la même concentration, la pirenzépine, l'AF-DX 116 et le tropicamide diminuent la réponse calcique induite par l'ACh de 31,93 ± 6,53%, 49,09 ± 10,93% et 76,60 ± 8,90% respectivement (Figure 29). Ces résultats montrent que le récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* est plus sensible au 4-DAMP qu'aux autres antagonistes des mAChRs testés, ce qui le rapproche d'un point de vue pharmacologique des récepteurs de sous-type M3 de mammifère.

3.3. Identification de la voie de signalisation du récepteur mAChR-A

En nous basant sur le constat que l'activation du récepteur mAChR-A exprimé dans des cellules *Sf*9 entraîne une hausse du calcium intracellulaire, nous avons cherché à caractériser la voie de signalisation activée par le mAChR-A. Nous avons dans un premier temps déterminé l'origine du calcium impliqué dans cette réponse. Nous avons pour cela soit retiré le calcium extracellulaire, soit bloqué la libération du calcium des stocks intracellulaires. Afin d'étudier l'effet de l'absence de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire, des expériences ont été réalisées en utilisant un liquide physiologique dépourvu de calcium (« Ca^{2+}-free ») en présence d'un chélateur de calcium, l'EGTA. En l'absence de calcium extracellulaire, l'application d'acétylcholine (10^{-4}M) induit une réponse diminuée de 66,50 ± 8,98% par rapport à la réponse induite en présence de calcium et pour la même concentration d'ACh. L'absence de blocage complet de la réponse en milieu dépourvu de calcium suggère qu'une partie du calcium impliqué dans la réponse induite par l'application d'ACh provient des stocks de calcium intracellulaires (Figure 30).

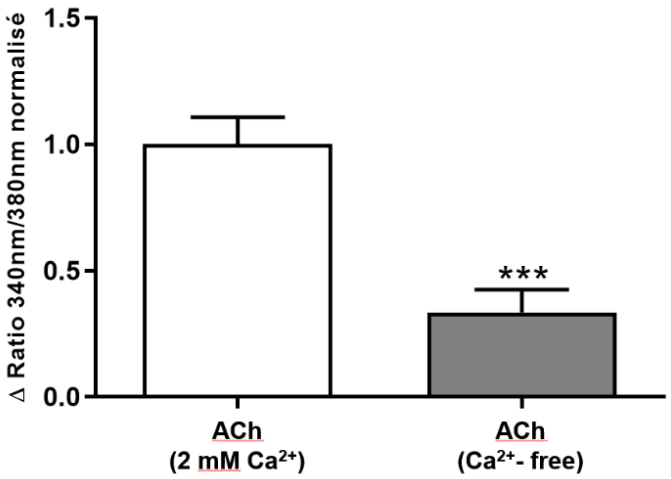

Figure 30 : Histogramme représentant l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'application d'ACh (10^{-4}M) en présence de calcium extracellulaire (2 mM Ca^{2+}) ou en absence de calcium extracellulaire (Ca^{2+} - free). (n=23 cellules issues de 3 transfections ; ***p<0,001 (test de Mann-Withney)).

Afin d'approfondir l'hypothèse de l'implication des stocks intracellulaires de calcium, des cellules *Sf*9 exprimant le récepteur mAChR-A ont été préincubées avec le 2-APB (10^{-5}M) qui est un inhibiteur connu des récepteurs à l'IP3 (IP3R). À la suite de la préincubation avec du 2-APB, la hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'application d'ACh (10^{-4}M) est réduite de 57,28 ± 6,70% (Figure 30). Considérant ce résultat et le fait que la séquence du récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* contienne des résidus connus pour faire partie d'une séquence consensus impliquée dans le couplage de protéines $G\alpha_{q/11}$ (Figure 19), nous avons donc cherché à déterminer si l'activation du récepteur mAChR-A entraîne l'induction de la voie des phosphoinositides pour provoquer cette hausse de la $[Ca^{2+}]_i$. Pour cela, des cellules *Sf*9 exprimant le récepteur mAChR-A ont été incubées en présence d'un inhibiteur de protéine $G\alpha_{q/11}$, le YM-254890, ou d'un inhibiteur de phospholipase C, le U-73122. La préincubation avec ces bloqueurs réduit fortement la variation de calcium induite par l'application d'ACh (10^{-4}M). Ainsi, en présence de YM-254890 ou de U-73122, la variation de calcium induite par l'application d'ACh ne correspond respectivement qu'à 1,90 ± 1,11% et à 3,22 ± 3,22% de la réponse calcique initiale (Figure 30). Ces résultats mettent en évidence que la stimulation du récepteur mAChR-A par les agonistes des mAChRs entraîne l'activation d'une protéine de type $G\alpha_{q/11}$ et de la phospholipase C.

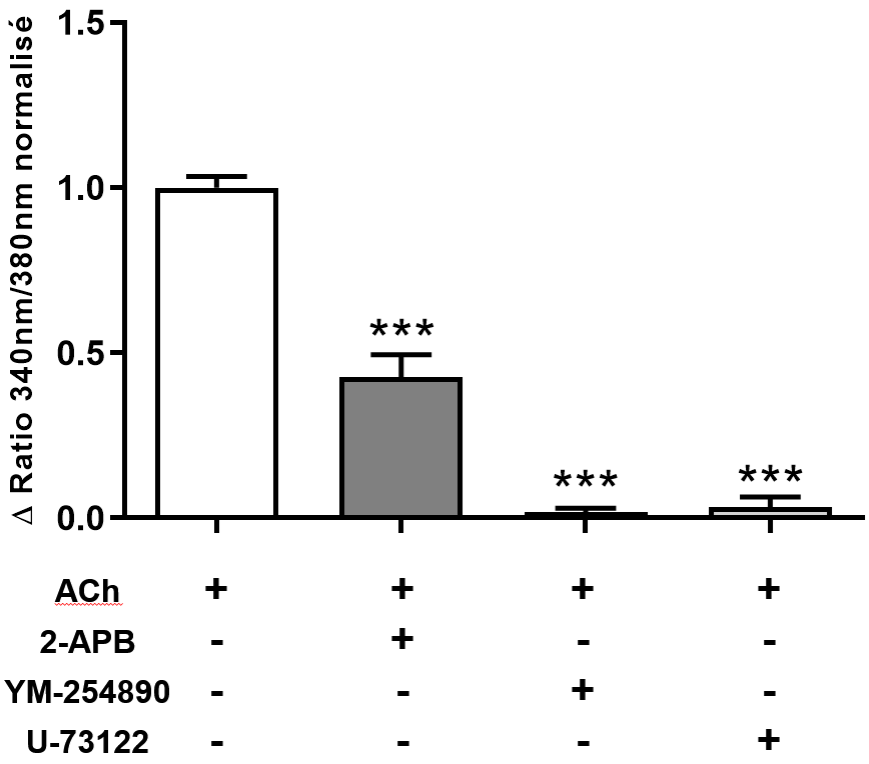

Figure 31 : Histogramme représentant l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'application d'ACh (10^{-4}M) après une préincubation avec les bloqueurs de protéines de la voie de signalisation couplée au récepteur mAChR-A : le 2-APB (10^{-5}M) un inhibiteur des IP3R, le YM-254890 (10^{-6}M) un inhibiteur de protéines Gαq/11 et le U-73122 (10^{-5}M) un inhibiteur de la phospholipase C (n=25 à 134 cellules issues de 3 à 6 transfections ; ***p<0,001 (test de Mann-Withney)).

4. L'activation du récepteur mAChR-A d'anophèle peut-elle moduler la sensibilité d'une cible aux insecticides ?

4.1. Étude de l'effet des répulsifs DEET et IR3535 sur le récepteur mAChR-A

De précédentes études menées au laboratoire ont montré chez la blatte *P. americana* que le DEET et l'IR3535 pouvaient augmenter respectivement la sensibilité au propoxur et au thiaclopride en agissant sur des récepteurs muscariniques (Abd-Ella *et al.* 2015; Moreau *et al.* 2020). Ces molécules pourraient donc être utilisées comme agent synergisant dans de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes vecteurs de maladie. Nous avons donc cherché à étudier l'effet de ces molécules sur le récepteur mAChR-A. Ces expérimentations ont été réalisées sur la lignée exprimant de façon stable le récepteur mAChR-A.

Dans un premier temps, il nous a fallu valider la lignée cellulaire. Pour cela, nous avons montré que l'application d'acétylcholine et d'oxotrémorine M ($5x10^{-7}$M) entrainait une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (n=26 à 71 cellules) dans la lignée stable exprimant le mAChR-A (*Sf*9-mAChR-A), mais pas dans la lignée exprimant de manière stable le vecteur pIB (*Sf*9-pIB-vide) (Figure 32). Ces résultats en accord avec ceux obtenus avec les cellules exprimant de façon transitoire le mAChR-A montrent que la lignée *Sf*9-mAChR-A exprime bien un récepteur fonctionnel.

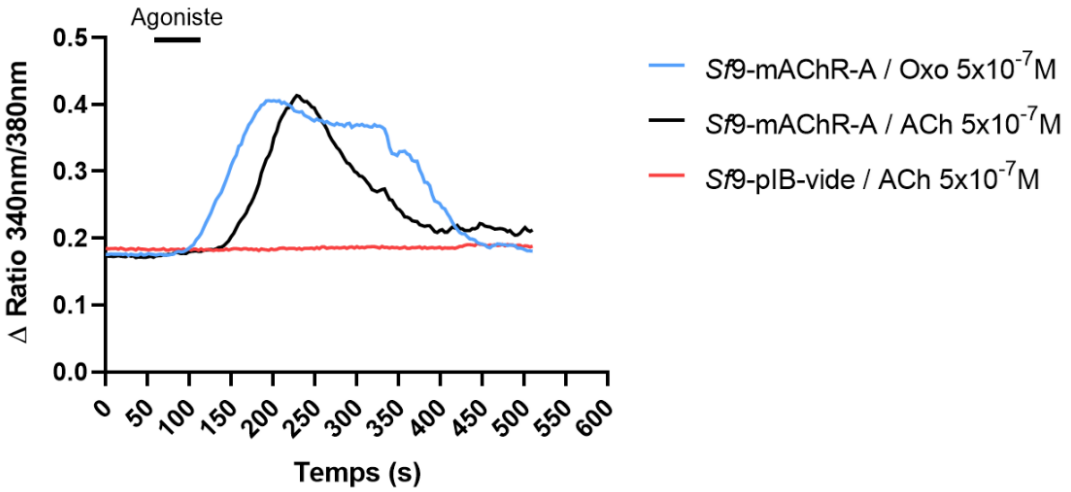

Figure 32 : Analyse de la variation du ratio 340nm/380nm dans les lignées stables exprimant le récepteur mAChR-A (*Sf*9-mAChR-A) ou le vecteur pIB (*Sf*9-pIB-vide) au cours du temps. Tracés représentant l'effet de l'acétylcholine et de l'oxotrémorine M ($5x10^{-7}$M) sur ces lignées stables.

Chez la blatte *P. americana*, le DEET agit comme un modulateur allostérique des mAChRs. Des expériences d'imagerie calcique ont été réalisées sur la lignée stable exprimant le mAChR-A afin de vérifier si ce composé pouvait moduler la réponse calcique induite par l'acétylcholine ou l'oxotrémorine M.

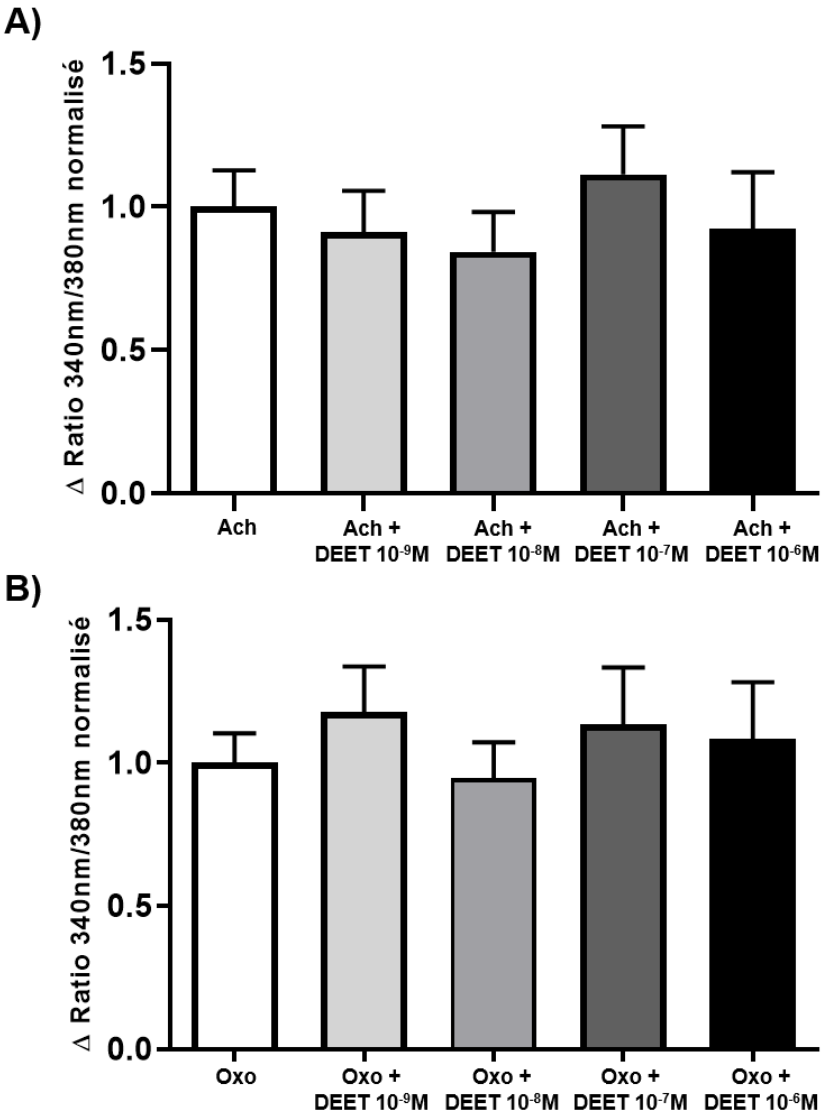

Figure 33 : Effet du DEET sur la réponse calcique induite par l'application d'acétylcholine (A) ou d'oxotrémorine M (B) sur la lignée stable *Sf*9-mAChR-A. Le Δ ratio 340nm/380nm est déterminé à la suite de l'application d'acétylcholine à l'EC_{50} ($3x10^{-7}$M) ou d'oxotrémorine M à l'EC_{50} ($5x10^{-7}$M) en présence de concentration croissante de DEET (10^{-9}M à 10^{-6}M). Les données sont normalisées au Δ ratio 340nm/380nm après une application d'acétylcholine ($3x10^{-7}$M) seule ou d'oxotrémorine M ($5x10^{-7}$M) seule. (n=21 à 99 cellules)

Aucune différence significative n'est observée entre les réponses de la lignée stable exprimant le mAChR-A aux agonistes seuls ou en présence de DEET, et ce quelle que soit l'agoniste ou la concentration de répulsif utilisée (Figure 33). Ces résultats montrent que le DEET n'agit pas comme modulateur allostérique du récepteur mAChR-A.

L'IR3535 agit également sur les récepteurs muscariniques de la blatte *P. americana* (Moreau *et al.* 2020). Cependant, en fonction de la concentration utilisée, l'IR3535 ne se fixe pas uniquement sur le site orthostérique. En effet, lorsqu'il est utilisé à faible concentration, il se fixe sur le site orthostérique alors que lorsqu'il est appliqué à forte concentration, il se fixe à la fois sur le site orthostérique et sur un site allostérique, entrainant alors une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Cependant, les expériences réalisées en imagerie calcique n'ont montré aucune augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans la lignée stable exprimant le mAChR-A en réponse à l'application de ce répulsif quelle que soit la concentration testée. Ainsi, ces données suggèrent que l'IR3535 n'agit pas sur le récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* exprimé dans la lignée stable exprimant le mAChR-A.

4.2. Impact de l'activation du récepteur mAChR-A sur la sensibilité de l'acétylcholinestérase à un insecticide

Des travaux antérieurs ont montré, sur des cellules *Sf*9 exprimant l'acetylcholinestérase 1 (AChE1) d'*An. gambiae*, que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ *via* l'application d'un virus augmentait la sensibilité de l'AChE1 à un insecticide : le chlorpyrifos-éthyl (Licznar *et al.* 2014). Nous avons donc cherché à voir si l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ *via* l'activation du mAChR-A pouvait moduler la sensibilité de l'AChE1 à cet insecticide organophosphoré dans des conditions similaires. Afin d'éviter les variations d'expression du récepteur mAChR-A induite par la transfection du plasmide, nous avons réalisé ces expériences sur les lignées stables *Sf*9-mAChR-A et *Sf*9-pIB-vide. L'expression de l'AChE1 du moustique *An. gambiae* est réalisée par la transfection du plasmide contenant la séquence codante de l'AChE1 nommé pIB/V5-His-*ace*1 (Licznar *et al.* 2014).

Les tests d'activité de l'acétylcholinestérase sont réalisés selon la méthode d'Ellman (Ellman *et al.* 1961). Cette méthode utilise comme substrat pour l'AChE : l'acétylthiocholine (AtCh), un analogue de l'ACh le ligand naturel de l'AChE. Par des expériences d'imagerie calcique, nous avons montré que l'application d'AtCh sur la lignée stable *Sf*9-mAChR-A entrainait bien une augmentation du ratio 340nm/380nm (n=44 cellules) (Figure 34) suggérant que l'AtCh peut être utilisée comme un agoniste du mAChR-A dans l'étude de la modulation de la sensibilité de l'AChE1 au chlorpyrifos-éthyl.

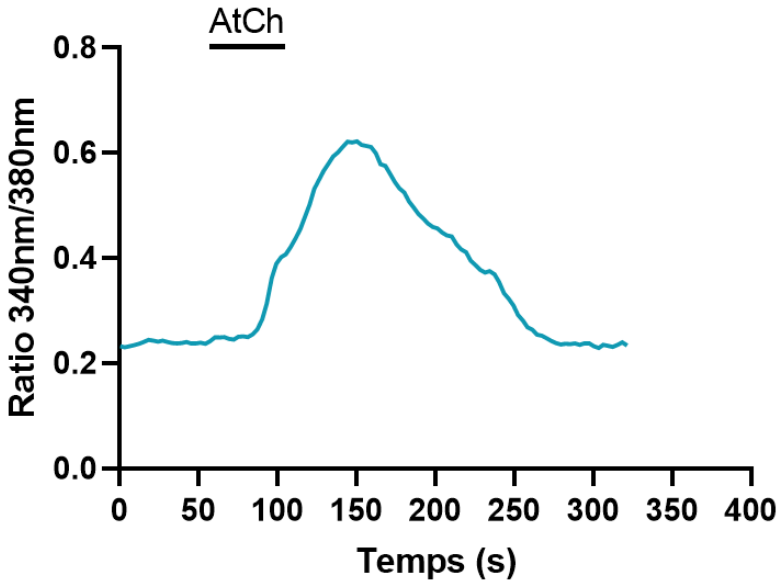

Figure 34 : Variation du ratio 340nm/380nm dans la lignée stable *Sf*9-mAChR-A au cours du temps. Tracé représentant la variation du ratio 340 nm/380 nm en fonction du temps après l'application d'acétylthiocholine (AtCh ; 10^{-4}M).

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'augmentation de calcium induite par l'activation des récepteurs mAChR-A *via* l'AtCh sur la sensibilité de l'AChE1 au chlorpyrifos-éthyl, dans les lignées stables *Sf*9-mAChR-A et *Sf*9-pIB-vide transfectées transitoirement avec le plasmide pIB/V5-His-*ace*1. Pour cela, des cellules de chaque lignée ont été incubées avec des concentrations croissantes d'insecticide (chlorpyrifos-éthyl : $5x10^{-9}$M à 10^{-4}M), puis l'activité de l'AChE1 a été mesurée selon la méthode d'Ellman (Figure 35). Aucune activité acétylcholinestérase n'a été observée dans les lignées stables non transfectées avec pIB/V5-His-*ace*1.

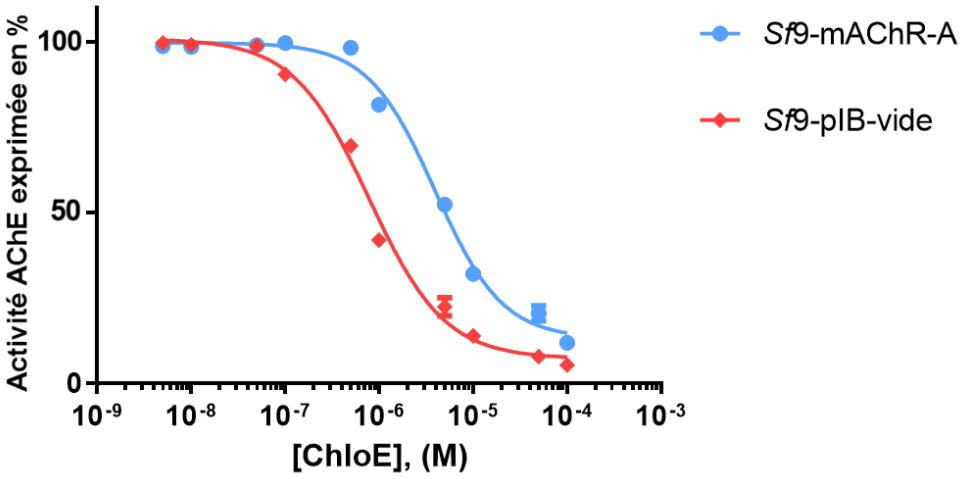

Figure 35 : Courbe représentant l'activité résiduelle en % de l'acétylcholinestérase 1 (AChE1) d'*An. gambiae*, exprimée dans les lignées stables exprimant le récepteur mAChR-A (*Sf*9-mAChR-A) ou le vecteur pIB/V5-His (*Sf*9-pIB-vide), en présence de concentrations croissantes de chlorpyrifos-éthyl (ChloE). (n=3)

La relation entre la concentration en chlopyrifos-éthyl et l'activité résiduelle de l'AChE1 permet de déterminer pour chacune des lignées l'inhibition maximale (Imax), l'IC_{50} qui correspond à la concentration induisant la moitié de l'inhibition maximale, ainsi que le coefficient de Hill (nH) (Tableau 7).

	Lignée *Sf*9-pIB-vide	Lignée *Sf*9-mAChR-A
IC_{50}	7,85 ± 1,17 x10^{-7}M	39,5 ± 0,59 x10^{-7}M
Imax	0,07 ± 0,03	0,13 ± 0,03
nH	-1,08 ± 0,20	-1,21 ± 0,20

Tableau 7 : Tableau récapitulatif de l'inhibition maximale, du coefficient de Hill (nH) et de l'IC_{50} du chlorpyrifos-éthyl pour chacune des lignées exprimant l'AChE1.

La comparaison des IC_{50} montre que l'AChE1 présente une sensibilité 5 fois plus faible au chlorpyrifos-éthyl dans la lignée *Sf*9-mAChR-A que dans la lignée *Sf*9-pIB-vide (Extra sum-of-squares F test ; p<0,0001). Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'activation du récepteur mAChR-A *via* l'application d'AtCh diminue la sensibilité de l'AChE1 d'*An. gambiae,* exprimée dans les cellules *Sf*9, au chlorpyrifos-éthyl. La comparaison de l'inhibition maximale entre les deux lignées montre que l'Imax est significativement 6% plus faible pour la lignée *Sf*9-mAChR-A (Extra sum-of-squares F test ; p<0,05). Ce résultat suggère que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'activation du récepteur mAChR-A diminue l'efficacité du chlorpyrifos-éthyl sur l'AChE1 d'anophèle exprimée dans les cellules *Sf*9.

Discussion, conclusions et perspectives

1. Discussion

L'objectif de ces travaux était de caractériser d'un point de vue moléculaire, pharmacologique et fonctionnel les récepteurs muscariniques d'un insecte vecteur de maladie, le moustique *Anopheles gambiae*, puis d'évaluer leur potentiel comme cible moléculaire d'un agent synergisant à un insecticide.

Chez les insectes, d'un point de vue moléculaire, les récepteurs muscariniques ont été décrits chez trois espèces. Chez la mouche *D. melanogaster,* trois types de mAChRs ont été décrits, les mAChR-A, mAChR-B et mAChR-C. Chez cette mouche, deux variants existent pour les récepteurs mAChR-A et mAChR-B. (Collin *et al.* 2013; Xia *et al.* 2016). Un récepteur muscarinique de type A a également été décrit chez la fourmi *P. vicina*, et un autre récepteur mAChR-A chez la chenille légionnaire du nord *M. separata* (Lü *et al.* 2011, 2020). Dans le génome du moustique *An. gambiae*, nous avons mis en évidence la présence de quatre séquences codantes pour des récepteurs muscariniques. Par homologie de séquence avec la drosophile, trois types de récepteurs muscariniques ont été identifiés : le récepteur mAChR-A, deux variants pour le récepteur mAChR-B et le récepteur mAChR-C. Les deux variants du mAChR-B sont nommés respectivement mAChR-B1 et mAChR-B2. Le clonage et le séquençage des séquences des récepteurs mAChR-A, mAChR-B1 et mAChR-C à partir d'ADNc issus de cellules nerveuses nous a permis de confirmer les séquences protéiques prédites. Bien que la séquence codante du récepteur mAChR-A diffère de 4 nucléotides et celle du récepteur mAChR-C de 3 nucléotides par rapport aux séquences prédites, ces mutations ponctuelles sont silencieuses. La séquence codante clonée pour le récepteur mAChR-B1 diffère de 6 nucléotides de la séquence prédite. Trois de ces mutations ponctuelles entrainent des substitutions au niveau de la séquence protéique (F98I, L242I, V370L). Le clonage du récepteur mAChR-B1 est issu de deux clones provenant de la même amplification par PCR, il devra donc être réitéré afin de pouvoir confirmer cette séquence. La séquence codante pour le récepteur mAChR-B2 n'a pu être amplifiée à partir des ADNc de cellules nerveuses. De plus, aucun transcrit de ce récepteur n'a pu être détecté par qPCR dans les cellules nerveuses. Ces résultats suggèrent que le récepteur mAChR-B2 n'est pas exprimé dans les cellules nerveuses issues de la tête d'anophèle. Cependant, le récepteur mAChR-B2 pourrait être exprimé au sein d'autres tissus de l'anophèle ou bien dans les cellules nerveuses d'autres parties du corps. L'analyse des séquences protéiques de ces récepteurs a montré qu'elles contiennent sept segments transmembranaires, un pont disulfure entre les boucles e1 et e2. Des résidus conservés dans la séquence de tous les mAChRs ainsi que des résidus impliqués dans le couplage aux protéines $G\alpha_{q/11}$ pour le récepteur mAChR-A et aux protéines $G\alpha_{i/o}$ pour le récepteur mAChR-B1. Dans la séquence du récepteur mAChR-C nous n'avons mis en évidence que deux des sept acides aminés connus comme étant impliqué dans la fixation de la protéine $G\alpha_{q/11}$. Cependant nous avons pu mettre en évidence dans la séquence du récepteur mAChR-C la présence de résidus impliquée dans le site de fixation de l'ACh ainsi que d'autres acides aminés conservés chez tous les mAChRs. Nous n'avons pas été en mesure de cloner le récepteur mAChR-B2, et nous n'avons donc pas pu analyser qu'une séquence prédite. Le récepteur mAChR-B2 diffère d'après les séquences prédites de 393 acides aminés, formant une délétion de 83 résidus au sein de la troisième boucle intracellulaire, ainsi qu'une seconde délétion de 310 résidus au sein de la même boucle. Les acides aminés d'importance identifiée dans le récepteur mAChR-B1 ne font pas partie des délétions observées dans la séquence prédite du récepteur mAChR-B2. Ainsi, la séquence prédite du récepteur mAChR-B2 contient

les acides aminés conservés chez les mAChRs, ainsi que les résidus identifiés comme permettant le couplage a une protéine $G\alpha_{i/o}$. Le clonage d'un récepteur mAChR-B2 permettrait de confirmer l'existence de ce variant du mAChR-B ainsi que de la présence de ces résidus au sein de la séquence. L'alignement de la séquence codante du récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* avec les deux variants du récepteur mAChR-A de *D. melanogaster* indique que le mAChR-A d'anophèle est plus proche de l'isoforme A de drosophile qui présente une boucle intracellulaire plus courte entre les TM5 et TM6 que l'isoforme B. Chez les vertébrés, cette boucle intracellulaire est connue pour être impliqué dans la désensibilisation et l'internalisation des mAChRs (Gurevich et Gurevich 2021). Cela suggère que le variant court du récepteur mAChR-A de drosophile et le récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* pourraient présenter une désensibilisation et une internalisation différentes du variant long du récepteur mAChR-A de *D. melanogaster*.

Grâce à des expériences de PCR quantitative, nous avons montré que les transcrits des récepteurs mAChR-A, mAChR-B1 et mAChR-C sont exprimés dans le système nerveux de l'anophèle. Nous n'avons cependant pas été en mesure de détecter le récepteur mAChR-B2. Les récepteurs mAChR-A et mAChR-B1 sont majoritairement exprimés aussi bien chez les larves que chez les imagos. Le récepteur mAChR-C, bien qu'il soit moins exprimé que les deux autres récepteurs, est quant à lui plus exprimé chez les larves que chez les imagos. Aucune différence significative d'expression entre les imagos mâles et femelles n'a été montrée. Chez *D. melanogaster*, les ARNm des récepteurs mAChR-A et mAChR-B sont aussi plus fortement exprimés chez les imagos mâles que les larves. Cependant, contrairement à l'anophèle, les récepteurs mAChR-A et mAChR-B sont moins exprimés au stade imaginal chez les femelles que chez les mâles. En effet, les drosophiles femelles présentent une plus faible expression des ARNm codant pour les récepteurs mAChR-A et mAChR-B dans la tête (Collin *et al.* 2013). Chez la drosophile, les ARNm du récepteur mAChR-C sont plus exprimés au stade larvaire qu'au stade imaginal. Le récepteur mAChR-C est également moins exprimé dans la tête des femelles que dans celle des mâles au stade d'imago (Xia *et al.* 2016). Ces résultats suggèrent que, chez les insectes, les différents mAChRs pourraient jouer des rôles différents au stade larvaire et au stade imaginal et que selon les espèces, leur fonction pourrait différer chez les mâles et les femelles. Ainsi, l'élaboration de potentielles stratégies impliquant des récepteurs muscariniques dans la lutte contre les insectes nuisibles devra prendre en compte l'espèce et le stade de développement (larve ou imago) afin de pouvoir cibler le type de récepteur souhaité.

Le calcium est un ion ubiquitaire jouant un rôle dans de nombreux processus cellulaires. Dans les neurones d'insecte, la modulation de la concentration de cet ion modifie la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides (Deshayes *et al.* 2018). De précédentes études ont démontré que des agents biologiques ou chimiques sont en mesure d'augmenter la sensibilité des cibles aux insecticides grâce à une hausse du calcium intracellulaire. Ces agents peuvent être des virus ciblant les cellules d'insectes (Licznar *et al.* 2014; Apaire-Marchais *et al.* 2016) ou des agents chimiques comme des répulsifs ou des insecticides (Abd-Ella *et al.* 2015; Pitti Caballero *et al.* 2019; Moreau *et al.* 2020). Les composés chimiques utilisés comme agents synergisants induisent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ conduisant à la sensibilisation des cibles moléculaires aux insecticides au travers de l'activation de voies de signalisation intracellulaires aboutissant à l'activation de la PKA, la PKC ou encore la CaM-kinase II (Lavialle-Defaix *et al.* 2010; Bodereau-Dubois *et al.* 2012; Calas-List *et al.* 2013; List *et al.* 2014; Raymond *et al.* 2017). De précédentes études réalisées au laboratoire SiFCIR indiquent que chez la blatte *P. americana*, l'activation de récepteurs muscariniques par des répulsifs à de faibles doses peut entrainer cette augmentation de calcium pouvant sensibiliser les cibles moléculaires aux insecticides (Abd-Ella *et al.* 2015;

Moreau *et al.* 2020). Notre attention s'est donc portée particulièrement sur les mAChR-A et mAChR-C car chez la drosophile, ces types de récepteurs entrainent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ lors de leur activation.

Chez le moustique *An. gambiae*, sept résidus conservés et faisant partie d'une séquence consensus impliquée dans le couplage aux protéines $G\alpha_{q/11}$ ont été identifiés dans la séquence protéique du récepteur mAChR-A. Dans la séquence du récepteur mAChR-C, seulement deux de ces résidus ont été identifiés (Haga *et al.* 2012; Ren *et al.* 2015). Afin d'étudier la pharmacologie et la signalisation cellulaire de ces récepteurs, nous avons transfecté un plasmide contenant leur séquence codante et permettant leur expression dans les cellules *Sf*9. L'application d'acétylcholine sur les cellules transfectées avec le plasmide pIB-mAChR-A entraine une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ alors que l'application de sérotonine, dopamine, tyramine ou de glutamate n'a pas d'effet. Aucune variation de calcium n'a été observée dans les cellules transfectées avec le vecteur plasmidique ne contenant pas de séquence de mAChR (piB/V5-His) ou avec le vecteur plasmidique contenant la séquence codant pour le mAChR-C d'*An. gambiae* (pIB-mAChR-C). L'absence des cinq résidus conservés dans les mAChRs chez de nombreuses espèces et connus pour être couplés aux protéines $G\alpha_{q/11}$ pourrait expliquer l'absence de signal. Cependant, ces acides aminés ne sont également pas présents dans la séquence du mAChR-C de drosophile (Xia *et al.* 2016). Le récepteur mAChR-C de *D. melanogaster* a été exprimé dans des cellules de mammifère, les cellules CHO-K1. Bien que les cellules *Sf*9 expriment des analogues des protéines G, nous pouvons raisonnablement supposer que ces dernières diffèrent des protéines $G\alpha_{q/11}$ des cellules de mammifère. Ainsi, l'absence de ces résidus conservés pourrait entrainer un défaut de couplage du récepteur mAChR-C d'anophèles aux analogues de protéines G des cellules *Sf*9.

Afin d'approfondir notre connaissance du récepteur mAChR-A et de permettre des études ultérieures de ce récepteur, nous avons caractérisé ce récepteur d'un point de vue pharmacologique. Pour cela, nous avons étudié l'évolution de la réponse calcique induite par l'activation de ce récepteur exprimé dans les cellules *Sf*9. Les propriétés pharmacologiques du mAChR-A d'*An. gambiae* sont proches de celles du mAChR-A de *D. melanogaster* et de *T. castaneum* (Collin *et al.* 2013). L'acétylcholine, la muscarine et l'oxotrémorine M activent le mAChR-A d'anophèle et l'atropine bloque la réponse calcique induite par l'application d'acétylcholine. De façon à affiner le profil pharmacologique, différents antagonistes ont été utilisés. Nous avons ainsi montré que le mAChR-A d'*An. gambiae* présente une plus grande affinité pour le 4-DAMP, un antagoniste connu pour être sélectif des récepteurs de sous-type M3 chez les mammifères (Caulfield 1993; Ishii et Kurachi 2006).

L'activation du mAChR-A entraine une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et sa séquence protéique contient une séquence consensus connue pour être impliquée dans le couplage aux protéines $G\alpha_{q/11}$. Nous avons donc cherché à caractériser la principale voie de signalisation activée par ce récepteur en partant du postulat qu'il était couplé à la voie des phosphoinositides. L'utilisation d'un liquide physiologique dépourvu de calcium, en imagerie calcique, n'abolit pas complètement la réponse calcique induite par l'activation du mAChR-A, ce qui suggère que les stocks de calcium intracellulaires sont impliqués. Afin d'explorer la signalisation intracellulaire couplée au mAChR-A d'*An. gambiae*, différents bloqueurs de protéines impliqués dans la voie des phosphoinositides ont été employés. Le YM-254890, un bloqueur sélectif de protéines $G\alpha_{q/11}$ (Nishimura *et al.* 2010) et le U-73122, un bloqueur de la phospholipase C, (Thompson *et al.* 1991) sont en mesure de bloquer l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'activation du mAChR-A de plus de 98% et 97% respectivement. Ainsi, nous avons montré que le récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* est couplé à une protéine $G\alpha_{q/11}$ et induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ par l'activation de la voie PLC/IP3.

De précédentes études ont montré que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'activation de mAChRs d'insectes par des répulsifs comme le DEET ou l'IR3535, utilisés à des doses subrépulsives, entraine une hausse de la sensibilité des cibles membranaires aux insecticides (Abd-Ella *et al.* 2015; Moreau *et al.* 2020). Nous avons alors étudié leur effet sur le récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* exprimé de façon stable dans des cellules *Sf*9. Ni le DEET, ni l'IR3535 n'a montré d'effet sur la lignée stable exprimant le mAChR-A. L'effet de ces composés sur les mAChRs a été étudié sur des neurones chez la blatte et le type moléculaire de mAChR sur lequel ils agissent n'a pas été déterminé. Cependant, les récepteurs activés par ces répulsifs sont de types pharmacologiques M1/M3 (Abd-Ella *et al.* 2015; Moreau *et al.* 2020). L'absence d'effet du DEET et de l'IR3535 dans nos expériences pourrait être expliquée par le fait que ces répulsifs cibleraient d'autres types de mAChRs que des mAChR-A. Une autre hypothèse pourrait imputer cette absence d'effet à la différence de cellule étudiée. En effet, nous avons exprimé le récepteur mAChR-A dans un système hétérologue, les cellules *Sf*9, qui proviennent initialement de tissus ovariens. Or, ces cellules ne possèdent peut-être pas les mêmes composants intracellulaires au niveau de la membrane que les neurones de blatte ce qui ne leur permettrait pas d'induire les réponses fines observées chez la blatte.

Les travaux de Licznar et collaborateurs ont montré que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par un virus dans des cellules *Sf*9 exprimant l'AChE1 d'*An. gambiae* pouvait augmenter la sensibilité de cette enzyme au chlorpyrifos-éthyl, un insecticide de la famille des organophosphorés (Licznar *et al.* 2014). Afin d'évaluer si l'augmentation de calcium induite par l'activation du mAChR-A d'*An. gambiae* pouvait modifier la sensibilité d'une cible membranaire à un insecticide, nous avons exprimé l'AChE1 d'anophèle dans les lignées stables exprimant le récepteur mAChR-A ou le plasmide pIB/V5-His non-récombiné. Dans ces expériences, le récepteur mAChR-A est activé par l'application d'acétylthiocholine, le substrat impliqué dans le dosage de l'activité AChE par la méthode d'Ellman (Ellman *et al.* 1961). Nos résultats montrent que l'AChE1 présente une sensibilité plus faible au chlorpyrifos-éthyl dans les cellules exprimant le récepteur mAChR-A que dans celles ne l'exprimant pas. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'activation du récepteur mAChR-A peut diminuer la sensibilité de l'AChE1 pour le chlorpyriphos-éthyl. La diminution de la sensibilité de l'AChE1 au chlorpyriphos-éthyl dans la lignée stable exprimant le récepteur mAChR-A est cependant cohérente avec les résultats existants chez la blatte *P. americana*. Bien qu'il ait été montré que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ *via* l'activation de mAChRs pouvait augmenter la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides, il a aussi été montré qu'une hausse trop importante de la $[Ca^{2+}]_i$ pouvait entrainer, à l'inverse, une diminution de la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides (Abd-Ella *et al.* 2015). Dans nos expérimentations, de fortes concentrations d'AtCh sont nécessaires pour le dosage de l'activité enzymatique de l'AChE1. Ces fortes concentrations d'AtCh pourraient être à l'origine d'une trop grande augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$, ce qui expliquerait la diminution de la sensibilité de l'AChE1 pour le chlorpyrifos-éthyl.

2. Conclusions et perspectives

L'ensemble des travaux réalisés nous a permis :

- d'identifier dans le génome du moustique *An. gambiae* quatre séquences correspondant à des récepteurs muscariniques et de les nommer mAChR-A, mAChR-B1, mAChR-B2 et mAChR-C par homologie de séquence avec ceux connus chez la drosophile.

- de cloner les séquences codantes pour les récepteurs mAChR-A, mAChR-B1 et mAChR-C et d'identifier dans leurs séquences les 7 segments transmembranaires, le pont disulfure entre les boucles extracellulaires e1 et e2, des acides aminés conservés chez tous les mAChRs, des résidus connus pour être impliqués dans le couplage aux protéines $G\alpha_{q/11}$ dans la séquence des récepteurs mAChR-A et mAChR-C et aux protéines $G\alpha_{i/o}$ dans la séquence du récepteur mAChR-B1.

- de mettre en évidence que les récepteurs mAChR-A, mAChR-B1 et mAChR-C sont exprimés dans le système nerveux de l'anophèle au stade larvaire et au stade imaginal, que les récepteurs mAChR-A et mAChR-B1 sont exprimés majoritairement et ce quel que soit le stade de développement et que le récepteur mAChR-C est plus exprimé dans le système nerveux des larves que dans le système nerveux des imagos.

- de montrer que l'activation du récepteur mAChR-A exprimé dans les cellules *Sf*9 conduit à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ par la voie de signalisation PLC/IP3.

- d'établir que le récepteur mAChR-A d'anophèle présentait une pharmacologie similaire à celle du récepteur mAChR-A de drosophile et qu'il présentait une forte affinité pour le 4-DAMP, un antagoniste sélectif des récepteurs de sous-type M3 des mammifères.

- de montrer que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules *Sf*9 induite par l'activation du récepteur mAChR-A pouvait moduler la sensibilité de l'AChE1 au chlorpyrifos-éthyl.

Les résultats présentés ici ainsi que les données existantes dans la littérature suggèrent que les récepteurs muscariniques pourraient être envisagés comme des cibles moléculaires dans le développement de nouvelles stratégies de lutte contre ces insectes vecteurs de maladie. Cependant, des études complémentaires devront être menées afin de pouvoir identifier précisément les récepteurs qui pourront être ciblés par un agent synergisant afin d'augmenter la sensibilité de l'insecte à un ou plusieurs insecticides.

Dans un premier temps, les caractérisations moléculaires, pharmacologiques et fonctionnelles des mAChRs devront être approfondies. La séquence codante pour le mAChR-B1 devra être clonée *de novo* afin de confirmer ou non les différences trouvées avec la séquence prédite. La pharmacologie et les voies de signalisation couplées aux récepteurs muscariniques de type B et de type C devront être également explorées. Des molécules pouvant être de possibles agents synergisants, comme le DEET ou l'IR3535, devront également être testées afin d'étudier leurs effets sur ces récepteurs.

Aucune augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ n'a pu être observée à la suite de l'application d'ACh sur des cellules *Sf*9 exprimant le récepteur mAChR-C d'anophèle. Une première hypothèse permettant d'expliquer cette absence de réponse est que le mAChR-C n'est pas exprimé dans la cellule et/ou qu'il n'est pas adressé à la membrane. L'expression d'une protéine de fusion mAChR-C-eGFP pourrait permettre de suivre sa localisation dans la cellule. Une seconde hypothèse est que la machinerie cellulaire des cellules *Sf*9 ne permet pas la transduction du signal du récepteur mAChR-C. En effet, l'expression et l'étude du mAChR-C de drosophile ont été réalisées non pas en cellules d'insecte, mais en cellules de mammifère, les cellules CHO-K1 (Xia *et al.* 2016). L'expression du mAChR-

C d'anophèle dans ces cellules pourrait également être envisagée afin de se placer dans les mêmes conditions d'études que celui de la drosophile. L'étude des récepteurs muscariniques de type C revêt d'une importance particulière. Il a en effet été montré que les orthologues du mAChR-C de drosophile et d'anophèle ne sont pas présents chez tous les insectes. Ces récepteurs sont par exemple absents du génome de l'abeille *Apis mellifera* et de la guêpe parasitoïde *Nassonia vitripennis* (Xia *et al.* 2016). La caractérisation des mAChR-C chez des insectes vecteurs de maladie phytopathogènes pourrait permettre leur étude dans le cadre de stratégies insecticides plus ciblées afin d'épargner certains insectes bénéfiques comme les abeilles ou les guêpes parasitoïdes. Ainsi, l'exploration d'autres génomes d'insectes devra être menée afin d'identifier quels insectes possèdent dans leurs génomes un orthologue du mAChR-C.

Les tests d'activité acétylcholinestérasique réalisés dans le cadre de cette étude ont permis de montrer que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'activation du mAChR-A entraine une diminution de la sensibilité de l'AChE1 au chlorpyrifos-éthyl. Or, les travaux d'Abd-Ella et collaborateurs ont montré qu'une augmentation trop importante de la $[Ca^{2+}]_i$ pouvait entrainer une diminution de la sensibilité de l'AChE dans les neurones de la blatte *P. americana* (Abd-Ella *et al.* 2015). Dans nos conditions expérimentales, l'agoniste activant le mAChR-A, l'acétylthiocholine, est également le substrat de l'AChE1. Afin de pouvoir doser l'activité enzymatique par la méthode d'Ellman, l'AtCh est donc en condition saturante, soit à forte concentration ($3{,}3x10^{-4}$M) ce qui provoque cette hausse trop importante de calcium. Afin de diminuer l'amplitude de la réponse calcique induite par l'AtCh, l'utilisation d'antagoniste du mAChR-A, et en particulier le 4-DAMP, pourrait permettre de vérifier si une augmentation plus modérée de la $[Ca^{2+}]_i$ dans notre modèle entrainerait une augmentation de la sensibilité de l'AChE1 pour le chlorpyrifos-éthyl.

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude sont basés sur l'expression des mAChRs dans un système hétérologue afin de pouvoir étudier ces récepteurs de façon isolée. Les cellules *Sf*9 découlent de cellules ovariennes de la pupe du papillon *Spodopetra frugiperda* et ont été décrites comme étant adaptées à l'étude des récepteurs couplés aux protéines G (Schneider et Seifert 2010). Cependant, la grande majorité des insecticides sont neurotoxiques (Field *et al.* 2017). La mise au point de stratégies reposant sur une synergie entre un composé ciblant les mAChRs et un insecticide devra être élaborée sur des neurones d'insecte directement. Les neurones d'*An. gambiae* peuvent être isolés à partir des têtes de moustiques par dissociation mécanique. Cette préparation de neurones de moustiques isolés a été décrite comme étant un modèle pour l'étude du mode d'action des insecticides et répulsifs (Lavialle-Defaix *et al.* 2011). Ainsi, afin de se rapprocher le plus possible de la réponse neuronale de l'insecte, l'étude de la stratégie que nous proposons pourrait être réalisée sur des neurones d'anophèles isolés. De plus, l'utilisation de technique d'extinction de l'expression de protéines comme l'interférence ARN permettrait l'étude de l'effet de l'activation d'un seul type de mAChR, en inhibant l'expression des autres types dans les neurones d'*An. gambiae*, mais aussi d'étudier de façon plus précise les voies de signalisation couplées à ces récepteurs *via* l'inhibition des acteurs protéiques de ces voies. Les récepteurs muscariniques jouant un rôle important dans de nombreux processus physiologiques chez les insectes comme le système moteur, le système sensoriel ou encore la mémorisation, la mise au point de stratégies d'inhibition des mAChRs *via* l'interférence ARN pourrait être une piste de recherche innovante à explorer afin de lutter de façon sélective contre les insectes vecteurs de maladie.

L'ensemble de nos travaux ainsi que les perspectives détaillées jusqu'à présent sont basés sur des études *in vitro*. Afin de mesurer l'efficacité réelle de la stratégie consistant à associer une molécule ciblant les mAChRs

à un insecticide en ayant pour objectifs d'augmenter la sensibilité et/ou l'efficacité de ce dernier, des tests de toxicité devront être réalisés *in vivo* sur des anophèles à différents stades de développement. De plus, la souche de moustique sur laquelle les expériences présentées ont été menées est une souche de laboratoire sensible aux insecticides. L'efficacité de la stratégie devra donc être également évaluée *in vivo* sur des souches résistantes.

Bibliographie

Abdallah, E. A. M., Eldefrawi, M. E. and Eldefrawi, A. T., 1991. Pharmacologic characterization of muscarinic receptors of insect brains. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 17 (2–3), 107–118.

Abd-Ella, A., Stankiewicz, M., Mikulska, K., Wieslaw Nowak, Pennetier, C., Goulu, M., Fruchart-Gaillard, C., Licznar, P., Apaire-Marchais, V., List, O., Corbel, V., Servent, D. and Lapied, B., 2015. The Repellent DEET Potentiates Carbamate Effects via Insect Muscarinic Receptor Interactions: An Alternative Strategy to Control Insect Vector-Borne Diseases. *PLOS ONE*, 10 (5), e0126406.

Allen, T. G. J., 1999. The role of N-, Q- and R-type Ca2+ channels in feedback inhibition of ACh release from rat basal forebrain neurones. *The Journal of Physiology*, 515 (1), 93–107.

Alout, H., Djogbénou, L., Berticat, C., Chandre, F. and Weill, M., 2008. Comparison of Anopheles gambiae and Culex pipiens acetycholinesterase 1 biochemical properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150 (3), 271–277.

Alphey, L., Benedict, M., Bellini, R., Clark, G. G., Dame, D. A., Service, M. W. and Dobson, S. L., 2010. Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 10 (3), 295–311.

Anagnostaras, S. G., Murphy, G. G., Hamilton, S. E., Mitchell, S. L., Rahnama, N. P., Nathanson, N. M. and Silva, A. J., 2003. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M 1 muscarinic receptor mutant mice. *Nature Neuroscience*, 6 (1), 51–58.

Apaire-Marchais, V., Ogliastro, M., Chandre, F., Pennetier, C., Raymond, V. and Lapied, B., 2016. Virus and calcium: an unexpected tandem to optimize insecticide efficacy: Virus-induced optimization of insecticide effects. *Environmental Microbiology Reports*, 8 (2), 168–178.

Aslanoglou, D., Alvarez-Curto, E., Marsango, S. and Milligan, G., 2015. Distinct Agonist Regulation of Muscarinic Acetylcholine M2-M3 Heteromers and Their Corresponding Homomers. *Journal of Biological Chemistry*, 290 (23), 14785–14796.

Awolola, T. S., Oduola, O. A., Strode, C., Koekemoer, L. L., Brooke, B. and Ranson, H., 2009. Evidence of multiple pyrethroid resistance mechanisms in the malaria vector Anopheles gambiae sensu stricto from Nigeria. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103 (11), 1139–1145.

Bainbridge, N. K., Koselke, L. R., Jeon, J., Bailey, K. R., Wess, J., Crawley, J. N. and Wrenn, C. C., 2008. Learning and memory impairments in a congenic C57BL/6 strain of mice that lacks the M2 muscarinic acetylcholine receptor subtype. *Behavioural Brain Research*, 190 (1), 50–58.

Balabanidou, V., Grigoraki, L. and Vontas, J., 2018. Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 68–74.

Balabanidou, V., Kampouraki, A., MacLean, M., Blomquist, G. J., Tittiger, C., Juárez, M. P., Mijailovsky, S. J., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., Antoine, S., Hemingway, J., Ranson, H., Lycett, G. J. and Vontas, J., 2016. Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in Anopheles gambiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (33), 9268–9273.

Bartko, S. J., Romberg, C., White, B., Wess, J., Bussey, T. J. and Saksida, L. M., 2011. Intact attentional processing but abnormal responding in M1 muscarinic receptor-deficient mice using an automated touchscreen method. *Neuropharmacology*, 61 (8), 1366–1378.

Basile, A. S., Fedorova, I., Zapata, A., Liu, X., Shippenberg, T., Duttaroy, A., Yamada, M. and Wess, J., 2002. Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (17), 11452–11457.

Bendor, J., Lizardi-Ortiz, J. E., Westphalen, R. I., Brandstetter, M., Hemmings Jr, H. C., Sulzer, D., Flajolet, M. and Greengard, P., 2010. AGAP1/AP-3-dependent endocytic recycling of M5 muscarinic receptors promotes dopamine release. *The EMBO Journal*, 29 (16), 2813–2826.

Berizzi, A. E., Gentry, P. R., Rueda, P., Hoedt, S. D., Sexton, P. M., Langmead, C. J. and Christopoulos, A., 2016. Molecular Mechanisms of Action of M5 Muscarinic Acetylcholine Receptor Allosteric Modulators. *Molecular Pharmacology*, 90 (4), 427–436.

Berizzi, A. E., Perry, C. J., Shackleford, D. M., Lindsley, C. W., Jones, C. K., Chen, N. A., Sexton, P. M., Christopoulos, A., Langmead, C. J. and Lawrence, A. J., 2018. Muscarinic M5 receptors modulate ethanol seeking in rats. *Neuropsychopharmacology*, 43 (7), 1510–1517.

Bian, G., Joshi, D., Dong, Y., Lu, P., Zhou, G., Pan, X., Xu, Y., Dimopoulos, G. and Xi, Z., 2013. Wolbachia Invades Anopheles stephensi Populations and Induces Refractoriness to Plasmodium Infection. *Science*, 340 (6133), 748–751.

Bielopolski, N., Amin, H., Apostolopoulou, A. A., Rozenfeld, E., Lerner, H., Huetteroth, W., Lin, A. C. and Parnas, M., 2019. Inhibitory muscarinic acetylcholine receptors enhance aversive olfactory learning in adult Drosophila. *eLife*, 8.

Bista, P., Pawlowski, M., Cerina, M., Ehling, P., Leist, M., Meuth, P., Aissaoui, A., Borsotto, M., Heurteaux, C., Decher, N., Pape, H.-C., Oliver, D., Meuth, S. G. and Budde, T., 2015. Differential phospholipase C-dependent modulation of TASK and TREK two-pore domain K+ channels in rat thalamocortical relay neurons. *The Journal of Physiology*, 593 (1), 127–144.

Blanc, V. and Davidson, N. O., 2010. APOBEC-1-mediated RNA editing. *WIREs Systems Biology and Medicine*, 2 (5), 594–602.

Bock, A., Schrage, R. and Mohr, K., 2018. Allosteric modulators targeting CNS muscarinic receptors. *Neuropharmacology*, 136, 427–437.

Bockaert, J. and Pin, J. P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal*, 18 (7), 1723–1729.

Bodereau-Dubois, B., List, O., Calas-List, D., Marques, O., Communal, P.-Y., Thany, S. H. and Lapied, B., 2012. Transmembrane Potential Polarization, Calcium Influx, and Receptor Conformational State Modulate the Sensitivity of the Imidacloprid-Insensitive Neuronal Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor to Neonicotinoid Insecticides. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341 (2), 326–339.

Bolden, C., Cusack, B. and Richelson, E., 1992. Antagonism by antimuscarinic and neuroleptic compounds at the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 260 (2), 576–580.

Boucrot, E., Ferreira, A. P. A., Almeida-Souza, L., Debard, S., Vallis, Y., Howard, G., Bertot, L., Sauvonnet, N. and McMahon, H. T., 2015. Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. *Nature*, 517 (7535), 460–465.

Boucrot, E. and McMahon, H. T., 2011. Initiation de l'endocytose par vésicules de clathrine - Des « sculpteurs de membrane » au travail. *médecine/sciences*, 27 (2), 122–125.

Bourdin, C. M., Moignot, B., Wang, L., Murillo, L., Juchaux, M., Quinchard, S., Lapied, B., Guérineau, N. C., Dong, K. and Legros, C., 2013. Intron Retention in mRNA Encoding Ancillary Subunit of Insect Voltage-Gated Sodium Channel Modulates Channel Expression, Gating Regulation and Drug Sensitivity. *PLOS ONE*, 8 (8), e67290.

Bouyer, J. and Vreysen, M. J. B., 2020. Yes, Irradiated Sterile Male Mosquitoes Can Be Sexually Competitive! *Trends in Parasitology*, 36 (11), 877–880.

Bradley, K. N., Rowan, E. G. and Harvey, A. L., 2003. Effects of muscarinic toxins MT2 and MT7, from green mamba venom, on m1, m3 and m5 muscarinic receptors expressed in Chinese Hamster Ovary cells. *Toxicon*, 41 (2), 207–215.

Broehan, G., Kroeger, T., Lorenzen, M. and Merzendorfer, H., 2013. Functional analysis of the ATP-binding cassette (ABC) transporter gene family of Tribolium castaneum. *BMC Genomics*, 14, 6.

Brown, D. A., 2010. Muscarinic Acetylcholine Receptors (mAChRs) in the Nervous System: Some Functions and Mechanisms. *Journal of Molecular Neuroscience*, 41 (3), 340–346.

Brown, D. A., 2018. Regulation of neural ion channels by muscarinic receptors. *Neuropharmacology*, 136 (Pt C), 383–400.

Brown, D. A. and Adams, P. R., 1980. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K + current in a vertebrate neurone. *Nature*, 283 (5748), 673–676.

Brown, D. A. and Passmore, G. M., 2009. Neural KCNQ (Kv7) channels. *British Journal of Pharmacology*, 156 (8), 1185–1195.

Brown, L. D. and Macaluso, K. R., 2016. Rickettsia felis, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. *Current Tropical Medicine Reports*, 3 (2), 27–39.

Bubser, M., Byun, N., Wood, M. R. and Jones, C. K., 2012. Muscarinic Receptor Pharmacology and Circuitry for the Modulation of Cognition. *In*: Fryer, A. D., Christopoulos, A., and Nathanson, N. M., eds. *Muscarinic Receptors*. Berlin, Heidelberg: Springer, 121–166.

Buchanan, R., 2018. Typhus and the spotted fevers. *British Journal of Hospital Medicine*, 79 (10), C146–C149.

Buhl, E., Schildberger, K. and Stevenson, P. A., 2008. A muscarinic cholinergic mechanism underlies activation of the central pattern generator for locust flight. *Journal of Experimental Biology*, 211 (14), 2346–2357.

Burstein, E. S., Spalding, T. A. and Brann, M. R., 1996. Constitutive activation of chimeric m2/m5 muscarinic receptors and delineation of G-protein coupling selectivity domains. *Biochemical Pharmacology*, 51 (4), 539–544.

Burstein, E. S., Spalding, T. A. and Brann, M. R., 1998. The Second Intracellular Loop of the m5 Muscarinic Receptor Is the Switch Which Enables G-protein Coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (38), 24322–24327.

Burstein, E. S., Spalding, T. A., Braüner-Osborne, H. and Brann, M. R., 1995. Constitutive activation of muscarinic receptors by the G-protein Gq. *FEBS Letters*, 363 (3), 261–263.

Burza, S., Croft, S. L. and Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis. *The Lancet*, 392 (10151), 951–970.

Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V. and Priotto, G., 2017. Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, 390 (10110), 2397–2409.

Büschges, A., Schmitz, J. and Bässler, U., 1995. Rhythmic patterns in the thoracic nerve cord of the stick insect induced by pilocarpine. *Journal of Experimental Biology*, 198 (2), 435–456.

Bymaster, F. P., Carter, P. A., Yamada, M., Gomeza, J., Wess, J., Hamilton, S. E., Nathanson, N. M., McKinzie, D. L. and Felder, C. C., 2003. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *European Journal of Neuroscience*, 17 (7), 1403–1410.

Cabezas, C. and Buño, W., 2006. Distinct Transmitter Release Properties Determine Differences in Short-Term Plasticity at Functional and Silent Synapses. *Journal of Neurophysiology*, 95 (5), 3024–3034.

Cabezas, C. and Buño, W., 2011. BDNF is required for the induction of a presynaptic component of the functional conversion of silent synapses. *Hippocampus*, 21 (4), 374–385.

Calas-List, D., List, O., Quinchard, S. and Thany, S. H., 2013. Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of α-bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors. *NeuroToxicology*, 37, 127–133.

Cano Lozano, V., Armengaud, C. and Gauthier, M., 2001. Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 187 (4), 249–254.

Cano Lozano, V. and Gauthier, M., 1998. Effects of the Muscarinic Antagonists Atropine and Pirenzepine on Olfactory Conditioning in the Honeybee. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59 (4), 903–907.

Cariño, F. A., Koener, J. F., Plapp, F. W. and Feyereisen, R., 1994. Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24 (4), 411–418.

Carlson, J., Suchman, E. and Buchatsky, L., 2006. Densoviruses for Control and Genetic Manipulation of Mosquitoes. *In*: *Advances in Virus Research*. Academic Press, 361–392.

Carnevale, P., Bosseno, M.-F., Molinier, M., Lancien, J., Le Pont, F. and Zoulani, A., 1979. Etude du cycle gonotrophique d'Anopheles gambiae (Diptera, Culicidae) (Giles, 1902) en zone de forêt dégradée d'Afrique centrale. *Cahiers ORSTOM.Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 17 (2), 55–75.

Carnevale, P. and Robert, V., eds. 2009. *Les anophèles: Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*. IRD Éditions.

Casida, J. E. and Durkin, K. A., 2013. Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chemico-Biological Interactions*, 203 (1), 221–225.

Caulfield, M. P., 1993. Muscarinic Receptors—Characterization, coupling and function. *Pharmacology & Therapeutics*, 58 (3), 319–379.

Caulfield, M. P. and Birdsall, N. J. M., 1998. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacological Reviews*, 50 (2), 279–290.

Chaccour, C., Lines, J. and Whitty, C. J. M., 2010. Effect of ivermectin on Anopheles gambiae mosquitoes fed on humans: the potential of oral insecticides in malaria control. *The Journal of Infectious Diseases*, 202 (1), 113–116.

Chareonviriyaphap, T., Bangs, M. J., Suwonkerd, W., Kongmee, M., Corbel, V. and Ngoen-Klan, R., 2013. Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasites & Vectors*, 6, 280.

Chen, S.-R., Chen, H., Yuan, W.-X., Wess, J. and Pan, H.-L., 2010. Dynamic Control of Glutamatergic Synaptic Input in the Spinal Cord by Muscarinic Receptor Subtypes Defined Using Knockout Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (52), 40427–40437.

Chen, S.-R., Chen, H., Yuan, W.-X., Wess, J. and Pan, H.-L., 2014. Differential Regulation of Primary Afferent Input to Spinal Cord by Muscarinic Receptor Subtypes Delineated Using Knockout Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (20), 14321–14330.

Chobu, M., Nkwengulila, G., Mahande, A. M., Mwang'onde, B. J. and Kweka, E. J., 2015. Direct and indirect effect of predators on Anopheles gambiae sensu stricto. *Acta Tropica*, 142, 131–137.

Chouin-Carneiro, T., Ant, T. H., Herd, C., Louis, F., Failloux, A. B. and Sinkins, S. P., 2020. Wolbachia strain wAlbA blocks Zika virus transmission in Aedes aegypti. *Medical and Veterinary Entomology*, 34 (1), 116–119.

Chuche, J., Auricau-Bouvery, N., Danet, J.-L. and Thiéry, D., 2017. Use the insiders: could insect facultative symbionts control vector-borne plant diseases? *Journal of Pest Science*, 90 (1), 51–68.

Claire, G., Jérémy B., Willem, T. and Renate, C. S., eds. 2017. *Pests and vector-borne diseases in the livestock industry*. Wageningen Academic Publishers.

Coates, K. and Robertson, K., 2013. Muscarinic acetylcholine receptors are required for nestmate-odor memory retrieval but not for olfaction in harvester ants (Pogonomyrmex barbatus). *Bios*, 84 (3), 158–164.

Collège des universitaires de maladies infectieuses et tropicales (France), Épaulard, O., Le Berre, R. and Chirouze, C., 2019. *ECN.Pilly 2020: maladies infectieuses et tropicales : prépa. ECN, tous les items d'infectiologie*.

Colletier, J.-P., Fournier, D., Greenblatt, H. M., Stojan, J., Sussman, J. L., Zaccai, G., Silman, I. and Weik, M., 2006. Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *The EMBO Journal*, 25 (12), 2746–2756.

Collin, C., Hauser, F., de Valdivia, E. G., Li, S., Reisenberger, J., Carlsen, E. M. M., Khan, Z., Hansen, N. Ø., Puhm, F., Søndergaard, L., Niemiec, J., Heninger, M., Ren, G. R. and Grimmelikhuijzen, C. J. P., 2013. Two types of muscarinic acetylcholine receptors in Drosophila and other arthropods. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70 (17), 3231–3242.

Cordova, D., Delpech, V. R., Sattelle, D. B. and Rauh, J. J., 2003. Spatiotemporal calcium signaling in a Drosophila melanogaster cell line stably expressing a Drosophila muscarinic acetylcholine receptor. *Invertebrate Neuroscience*, 5 (1), 19–28.

Costa, L. G., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366 (1), 1–13.

de la Cour, C., Sørensen, G., Wortwein, G., Weikop, P., Dencker, D., Fink-Jensen, A. and Molander, A., 2015. Enhanced self-administration of alcohol in muscarinic acetylcholine M4 receptor knockout mice. *European Journal of Pharmacology*, 746, 1–5.

Courjaret, R. and Lapied, B., 2001. Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Molecular Pharmacology*, 60 (1), 80–91.

Croy, C. H., Chan, W. Y., Castetter, A. M., Watt, M. L., Quets, A. T. and Felder, C. C., 2016. Characterization of PCS1055, a novel muscarinic M4 receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*, 782, 70–76.

Das Chakraborty, S. and Sachse, S., 2021. Olfactory processing in the lateral horn of Drosophila. *Cell and Tissue Research*, 383 (1), 113–123.

David, J.-P., Ismail, H. M., Chandor-Proust, A. and Paine, M. J. I., 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368 (1612).

Davies, T. G. E., Field, L. M., Usherwood, P. N. R. and Williamson, M. S., 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life*, 59 (3), 151–162.

Delmas, P., Abogadie, F. C., Dayrell, M., Haley, J. E., Milligan, G., Caulfield, M. P., Brown, D. A. and Buckley, N. J., 1998. G-proteins and G-protein subunits mediating cholinergic inhibition of N-type calcium currents in sympathetic neurons. *European Journal of Neuroscience*, 10 (5), 1654–1666.

Delmas, P. and Brown, D. A., 2005. Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nature Reviews Neuroscience*, 6 (11), 850–862.

Dermauw, W. and Van Leeuwen, T., 2014. The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45, 89–110.

Derst, C., Walther, C., Veh, R. W., Wicher, D. and Heinemann, S. H., 2006. Four novel sequences in Drosophila melanogaster homologous to the auxiliary Para sodium channel subunit TipE. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339 (3), 939–948.

Derua, Y. A., Kweka, E. J., Kisinza, W. N., Githeko, A. K. and Mosha, F. W., 2019. Bacterial larvicides used for malaria vector control in sub-Saharan Africa: review of their effectiveness and operational feasibility. *Parasites & Vectors*, 12 (1), 426.

Deshayes, C., Moreau, E., Pitti-Caballero, J., Froger, J.-A., Apaire-Marchais, V. and Lapied, B., 2018. Synergistic agent and intracellular calcium, a successful partnership in the optimization of insecticide efficacy. *Current Opinion in Insect Science*, 30, 52–58.

Di Maio, V., Ventriglia, F. and Santillo, S., 2016. AMPA/NMDA cooperativity and integration during a single synaptic event. *Journal of Computational Neuroscience*, 41 (2), 127–142.

Dong, Y., Das, S., Cirimotich, C., Souza-Neto, J. A., McLean, K. J. and Dimopoulos, G., 2011. Engineered Anopheles Immunity to Plasmodium Infection. *PLOS Pathogens*, 7 (12), e1002458.

Dörje, F., Wess, J., Lambrecht, G., Tacke, R., Mutschler, E. and Brann, M. R., 1991. Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 256 (2), 727–733.

Dror, R. O., Green, H. F., Valant, C., Borhani, D. W., Valcourt, J. R., Pan, A. C., Arlow, D. H., Canals, M., Lane, J. R., Rahmani, R., Baell, J. B., Sexton, P. M., Christopoulos, A. and Shaw, D. E., 2013. Structural basis for modulation of a G-protein-coupled receptor by allosteric drugs. *Nature*, 503 (7475), 295–299.

Dudai, Y. and Ben-Barak, J., 1977. Muscarinic receptor in Drosophila melanogaster demonstrated by binding of [3H]quinuclidinyl benzilate. *FEBS Letters*, 81 (1), 134–136.

Duttaroy, A., Gomeza, J., Gan, J.-W., Siddiqui, N., Basile, A. S., Harman, W. D., Smith, P. L., Felder, C. C., Levey, A. I. and Wess, J., 2002. Evaluation of Muscarinic Agonist-Induced Analgesia in Muscarinic Acetylcholine Receptor Knockout Mice. *Molecular Pharmacology*, 62 (5), 1084–1093.

Duvallet, G. and Boireau, P., 2015. Autres maladies parasitaires à transmission vectorielle : helminthoses animales, besnoitiose bovine et paludisme, 34 (2), 641.

Dyck, V. A., Hendrichs, J. and Robinson, A. S., 2021. *Sterile Insect Technique : Principles And Practice In Area-Wide Integrated Pest Management*. Taylor & Francis.

Echeverria, L. E. and Morillo, C. A., 2019. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 33 (1), 119–134.

Eglen, R. M., 2005. Muscarinic Receptor Subtype Pharmacology and Physiology. *In*: King, F. D. and Lawton, G., eds. *Progress in Medicinal Chemistry*. Elsevier, 105–136.

Eglen, R. M., 2012. Overview of Muscarinic Receptor Subtypes. *In*: Fryer, A. D., Christopoulos, A., and Nathanson, N. M., eds. *Muscarinic Receptors*. Berlin, Heidelberg: Springer, 3–28.

Eigenbrode, S. D., Bosque-Pérez, N. A. and Davis, T. S., 2018. Insect-Borne Plant Pathogens and Their Vectors: Ecology, Evolution, and Complex Interactions. *Annual Review of Entomology*, 63 (1), 169–191.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7 (2), 88–95.

Enayati, A. A., Ranson, H. and Hemingway, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14 (1), 3–8.

Es-Salah, Z., Lapied, B., Le Goff, G. and Hamon, A., 2008. RNA editing regulates insect gamma-aminobutyric acid receptor function and insecticide sensitivity. *Neuroreport*, 19 (9), 939–943.

Feng, X., Li, M. and Liu, N., 2018. Carboxylesterase genes in pyrethroid resistant house flies, Musca domestica. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 92, 30–39.

Fernández de Sevilla, D. and Buño, W., 2003. Presynaptic inhibition of Schaffer collateral synapses by stimulation of hippocampal cholinergic afferent fibres. *European Journal of Neuroscience*, 17 (3), 555–558.

Fernández de Sevilla, D. and Buño, W., 2010. The Muscarinic Long-Term Enhancement of NMDA and AMPA Receptor-Mediated Transmission at Schaffer Collateral Synapses Develop through Different Intracellular Mechanisms. *Journal of Neuroscience*, 30 (33), 11032–11042.

Fernández de Sevilla, D., Cabezas, C., Prada, A. N. O. de, Sánchez-Jiménez, A. and Buño, W., 2002. Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *The Journal of Physiology*, 545 (1), 51–63.

Fernández de Sevilla, D., Núñez, A., Borde, M., Malinow, R. and Buño, W., 2008. Cholinergic-Mediated IP3-Receptor Activation Induces Long-Lasting Synaptic Enhancement in CA1 Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 28 (6), 1469–1478.

Fernández de Sevilla, D., Núñez, A. and Buño, W., 2021. Muscarinic Receptors, from Synaptic Plasticity to its Role in Network Activity. *Neuroscience*, 456, 60–70.

Ffrench-Constant, R. H., Rocheleau, T. A., Steichen, J. C. and Chalmers, A. E., 1993. A point mutation in a Drosophila GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature*, 363 (6428), 449–451.

Field, L. M., Emyr Davies, T. G., O'Reilly, A. O., Williamson, M. S. and Wallace, B. A., 2017. Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides. *European Biophysics Journal*, 46 (7), 675–679.

Fink-Jensen, A., Fedorova, I., Wörtwein, G., Woldbye, D. P. D., Rasmussen, T., Thomsen, M., Bolwig, T. G., Knitowski, K. M., McKinzie, D. L., Yamada, M., Wess, J. and Basile, A., 2003. Role for M5 muscarinic acetylcholine receptors in cocaine addiction. *Journal of Neuroscience Research*, 74 (1), 91–96.

Fishilevich, E. and Vosshall, L. B., 2005. Genetic and Functional Subdivision of the Drosophila Antennal Lobe. *Current Biology*, 15 (17), 1548–1553.

Franz, A. W. E., Kantor, A. M., Passarelli, A. L. and Clem, R. J., 2015. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, 7 (7), 3741–3767.

Galizia, C. G., 2014. Olfactory coding in the insect brain: data and conjectures. *European Journal of Neuroscience*, 39 (11), 1784–1795.

Gallet, R., Michalakis, Y. and Blanc, S., 2018. Vector-transmission of plant viruses and constraints imposed by virus–vector interactions. *Current Opinion in Virology*, 33, 144–150.

Gamper, N., Reznikov, V., Yamada, Y., Yang, J. and Shapiro, M. S., 2004. Phosphotidylinositol 4,5-Bisphosphate Signals Underlie Receptor-Specific Gq/11-Mediated Modulation of N-Type Ca2+ Channels. *Journal of Neuroscience*, 24 (48), 10980–10992.

Gauthier, M., Cano-Lozano, V., Zaoujal, A. and Richard, D., 1994. Effects of intracranial injections of scopolamine on olfactory conditioning retrieval in the honeybee. *Behavioural Brain Research*, 63 (2), 145–149.

Gentile, J. E., Rund, S. S. and Madey, G. R., 2015. Modelling sterile insect technique to control the population of Anopheles gambiae. *Malaria Journal*, 14 (1), 92.

Gentry, P. R., Kokubo, M., Bridges, T. M., Cho, H. P., Smith, E., Chase, P., Hodder, P. S., Utley, T. J., Rajapakse, A., Byers, F., Niswender, C. M., Morrison, R. D., Daniels, J. S., Wood, M. R., Conn, P. J. and Lindsley, C. W., 2014. Discovery, Synthesis and Characterization of a Highly Muscarinic Acetylcholine Receptor (mAChR)-Selective M5-Orthosteric Antagonist, VU0488130 (ML381): A Novel Molecular Probe. *ChemMedChem*, 9 (8), 1677–1682.

Gerber, A. P. and Keller, W., 2001. RNA editing by base deamination: more enzymes, more targets, new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences*, 26 (6), 376–384.

Gerschenfeld, H. M., 1973. Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiological Reviews*, 53 (1), 1–119.

Ghosh, S. K. and Dash, A. P., 2007. Larvivorous fish against malaria vectors: a new outlook. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101 (11), 1063–1064.

Glaaser, I. W. and Slesinger, P. A., 2015. Chapter Four - Structural Insights into GIRK Channel Function. *In*: Slesinger, P. A. and Wickman, K., eds. *International Review of Neurobiology*. Academic Press, 117–160.

Gomeza, J., Shannon, H., Kostenis, E., Felder, C., Zhang, L., Brodkin, J., Grinberg, A., Sheng, H. and Wess, J., 1999. Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (4), 1692–1697.

Gomeza, J., Zhang, L., Kostenis, E., Felder, C., Bymaster, F., Brodkin, J., Shannon, H., Xia, B., Deng, C. and Wess, J., 1999. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M4 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96 (18), 10483–10488.

Gorczyca, M. G., Budnik, V., White, K. and Wu, C. F., 1991. Dual muscarinic and nicotinic action on a motor program in Drosophila. *Journal of Neurobiology*, 22 (4), 391–404.

Gould, R. W., Dencker, D., Grannan, M., Bubser, M., Zhan, X., Wess, J., Xiang, Z., Locuson, C., Lindsley, C. W., Conn, P. J. and Jones, C. K., 2015. Role for the M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor in Top-Down Cognitive Processing Using a Touchscreen Visual Discrimination Task in Mice. *ACS Chemical Neuroscience*, 6 (10), 1683–1695.

Goutagny, R., Comte, J.-C., Salvert, D., Gomeza, J., Yamada, M., Wess, J., Luppi, P.-H. and Fort, P., 2005. Paradoxical Sleep in Mice Lacking M3 and M2/M4 Muscarinic Receptors. *Neuropsychobiology*, 52 (3), 140–146.

Grau-Bové, X. and Weetman, D., 2020. RNA editing: an overlooked source of fine-scale adaptation in insect vectors? *Current Opinion in Insect Science*, 40, 48–55.

Gregory, K. J., Hall, N. E., Tobin, A. B., Sexton, P. M. and Christopoulos, A., 2010. Identification of Orthosteric and Allosteric Site Mutations in M2 Muscarinic Acetylcholine Receptors That Contribute to Ligand-selective Signaling Bias. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (10), 7459–7474.

Grienberger, C. and Konnerth, A., 2012a. Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*, 73 (5), 862–885.

Griffin, M. T., Figueroa, K. W., Liller, S. and Ehlert, F. J., 2007. Estimation of Agonist Activity at G Protein-Coupled Receptors: Analysis of M2 Muscarinic Receptor Signaling through $G_{i/o}$, G_s, and G_{15}. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 321 (3), 1193–1207.

Grigoraki, L., Pipini, D., Labbé, P., Chaskopoulou, A., Weill, M. and Vontas, J., 2017. Carboxylesterase gene amplifications associated with insecticide resistance in Aedes albopictus: Geographical distribution and evolutionary origin. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11 (4).

Gurevich, E. V. and Gurevich, V. V., 2021. GRKs as Modulators of Neurotransmitter Receptors. *Cells*, 10 (1), 52.

Gurevich, V. V. and Gurevich, E. V., 2019. GPCR Signaling Regulation: The Role of GRKs and Arrestins. *Frontiers in Pharmacology*, 10.

Haga, K., Kameyama, K., Haga, T., Kikkawa, U., Shiozaki, K. and Uchiyama, H., 1996. Phosphorylation of Human m1 Muscarinic Acetylcholine Receptors by G Protein-coupled Receptor Kinase 2 and Protein Kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (5), 2776–2782.

Haga, K., Kruse, A. C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W. I., Okada, T., Kobilka, B. K., Haga, T. and Kobayashi, T., 2012. Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature*, 482 (7386), 547–551.

Halbach, R., Junglen, S. and van Rij, R. P., 2017. Mosquito-specific and mosquito-borne viruses: evolution, infection, and host defense. *Current Opinion in Insect Science*, 22, 16–27.

Hamilton, S. E., Loose, M. D., Qi, M., Levey, A. I., Hille, B., McKnight, G. S., Idzerda, R. L. and Nathanson, N. M., 1997. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (24), 13311–13316.

Hamzaoui, B. E., Zurita, A., Cutillas, C. and Parola, P., 2020. Fleas and flea-borne diseases of North Africa. *Acta Tropica*, 211, 105627.

Harvey, A. L., Kornisiuk, E., Bradley, K. N., Cerveñansky, C., Durán, R., Adrover, M., Sánchez, G. and Jerusalinsky, D., 2002. Effects of Muscarinic Toxins MT1 and MT2 from Green Mamba on Different Muscarinic Cholinoceptors. *Neurochemical Research*, 27 (11), 1543–1554.

Hasebe, M. and Yoshino, M., 2016. Nitric oxide/cGMP/PKG signaling pathway activated by M1-type muscarinic acetylcholine receptor cascade inhibits Na+ activated K+ currents in Kenyon cells. *Journal of Neurophysiology*, 115 (6), 3174–3185.

Hashiguchi, Y. and Gomez, E. A., 2018. Importance of Leishmania Species and Vector Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Identification. *Journal of Medical Entomology*, 55 (4), 773–774.

Heinrich, R., Wenzel, B. and Elsner, N., 2001. A role for muscarinic excitation: Control of specific singing behavior by activation of the adenylate cyclase pathway in the brain of grasshoppers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (17), 9919–9923.

Helleu, Q., Gérard, P. R. and Montchamp-Moreau, C., 2015. Sex Chromosome Drive. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7 (2).

Hern, J. A., Baig, A. H., Mashanov, G. I., Birdsall, B., Corrie, J. E. T., Lazareno, S., Molloy, J. E. and Birdsall, N. J. M., 2010. Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (6), 2693–2698.

Herrick-Davis, K., Grinde, E., Cowan, A. and Mazurkiewicz, J. E., 2013. Fluorescence Correlation Spectroscopy Analysis of Serotonin, Adrenergic, Muscarinic, and Dopamine Receptor Dimerization: The Oligomer Number Puzzle. *Molecular Pharmacology*, 84 (4), 630–642.

Hershko, A. and Ciechanover, A., 1998. The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry*, 67 (1), 425–479.

Heydorn, A., Søndergaard, B. P., Ersbøll, B., Holst, B., Nielsen, F. C., Haft, C. R., Whistler, J. and Schwartz, T. W., 2004. A Library of 7TM Receptor C-terminal Tails: INTERACTIONS WITH THE PROPOSED POST-ENDOCYTIC SORTING PROTEINS ERM-BINDING PHOSPHOPROTEIN 50 (EBP50), N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR (NSF), SORTING NEXIN 1 (SNX1), AND G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR-ASSOCIATED SORTING PROTEIN (GASP). *Journal of Biological Chemistry*, 279 (52), 54291–54303.

Hill, C. A., Sharan, S. and Watts, V. J., 2018. Genomics, GPCRs and new targets for the control of insect pests and vectors. *Current Opinion in Insect Science*, 30, 99–106.

Hill-Eubanks, D., Burstein, E. S., Spalding, T. A., Bräuner-Osborne, H. and Brann, M. R., 1996. Structure of a G-protein-coupling Domain of a Muscarinic Receptor Predicted by Random Saturation Mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (6), 3058–3065.

Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P. H., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y. S., Dong, Y., Cook, H., Axford, J., Callahan, A. G., Kenny, N., Omodei, C., McGraw, E. A., Ryan, P. A., Ritchie, S. A., Turelli, M. and O'Neill, S. L., 2011. Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476 (7361), 454–457.

Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nusskern, D. R., Wincker, P., Clark, A. G., Ribeiro, J. M. C., Wides, R., Salzberg, S. L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W. H., Rusch, D. B., Lai, Z., Kraft, C. L., Abril, J. F., Anthouard, V., Arensburger, P., Atkinson, P. W., Baden, H., de Berardinis, V., Baldwin, D., Benes, V., Biedler, J., Blass, C., Bolanos, R., Boscus, D., Barnstead, M., Cai, S., Center, A., Chatuverdi, K., Christophides, G. K., Chrystal, M. A., Clamp, M., Cravchik, A., Curwen, V., Dana, A., Delcher, A., Dew, I., Evans, C. A., Flanigan, M., Grundschober-Freimoser, A., Friedli, L., Gu, Z., Guan, P., Guigo, R., Hillenmeyer, M. E., Hladun, S. L., Hogan, J. R., Hong, Y. S., Hoover, J., Jaillon, O., Ke, Z., Kodira, C., Kokoza, E., Koutsos, A., Letunic, I., Levitsky, A., Liang, Y., Lin, J.-J., Lobo, N. F., Lopez, J. R., Malek, J. A., McIntosh, T. C., Meister, S., Miller, J., Mobarry, C., Mongin, E., Murphy, S. D., O'Brochta, D. A., Pfannkoch, C., Qi, R., Regier, M. A., Remington, K., Shao, H., Sharakhova, M. V., Sitter, C. D., Shetty, J., Smith, T. J., Strong, R., Sun, J., Thomasova, D., Ton, L. Q., Topalis, P., Tu, Z., Unger, M. F., Walenz, B., Wang, A., Wang, J., Wang, M., Wang, X., Woodford, K. J., Wortman, J. R., Wu, M., Yao, A., Zdobnov, E. M., Zhang, H., Zhao, Q., Zhao, S., Zhu, S. C., Zhimulev, I., Coluzzi, M., della Torre, A., Roth, C. W., Louis, C., Kalush, F., Mural, R. J., Myers, E. W., Adams, M. D., Smith, H. O., Broder, S., Gardner, M. J., Fraser, C. M., Birney, E., Bork, P., Brey, P. T., Venter, J. C., Weissenbach, J., Kafatos, F. C., Collins, F. H. and Hoffman, S. L., 2002. The Genome Sequence of the Malaria Mosquito Anopheles gamblae. *Science*, 298 (5591), 129–149.

Honda, H., Tomizawa, M. and Casida, J. E., 2007. Insect muscarinic acetylcholine receptor: pharmacological and toxicological profiles of antagonists and agonists. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (6), 2276–2281.

Huang, F., Buchwald, P., Browne, C. E., Farag, H. H., Wu, W.-M., Ji, F., Hochhaus, G. and Bodor, N., 2001. Receptor binding studies of soft anticholinergic agents. *AAPS PharmSci*, 3 (4), 44–56.

Huang, W., Reyes-Caldas, P., Mann, M., Seifbarghi, S., Kahn, A., Almeida, R. P. P., Béven, L., Heck, M., Hogenhout, S. A. and Coaker, G., 2020. Bacterial Vector-Borne Plant Diseases: Unanswered Questions and Future Directions. *Molecular Plant*, 13 (10), 1379–1393.

Hulme, E. C., Lu, Z. L., Saldanha, J. W. and Bee, M. S., 2003. Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochemical Society Transactions*, 31 (1), 29–34.

Ikeda, S. R., 1996. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein β γsubunits. *Nature*, 380 (6571), 255–258.

Ingham, V. A., Anthousi, A., Douris, V., Harding, N. J., Lycett, G., Morris, M., Vontas, J. and Ranson, H., 2020. A sensory appendage protein protects malaria vectors from pyrethroids. *Nature*, 577 (7790), 376–380.

Institut Pasteur, 2013. Fiche maladie Paludisme.

IRAC, 2021. *Resistance basics | Insecticide Resistance Action Commiee (IRAC)*. Available from: https://irac-online.org/about/resistance/ [Accessed 4 Mar 2021].

Ishii, M. and Kurachi, Y., 2006. Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Current Pharmaceutical Design*, 12 (28), 3573–3581.

Islam, W., Noman, A., Naveed, H., Alamri, S. A., Hashem, M., Huang, Z. and Chen, H. Y. H., 2020. Plant-insect vector-virus interactions under environmental change. *Science of The Total Environment*, 701, 135044.

Ismail, N., Christine, S., Robinson, G. E. and Fahrbach, S. E., 2008. Pilocarpine improves recognition of nestmates in young honey bees. *Neuroscience letters*, 439 (2), 178–181.

Ismail, N., Robinson, G. E. and Fahrbach, S. E., 2006. Stimulation of muscarinic receptors mimics experience-dependent plasticity in the honey bee brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (1), 207–211.

Jakubík, J., Bačáková, L., El-Fakahany, E. E. and Tuček, S., 1997. Positive Cooperativity of Acetylcholine and Other Agonists with Allosteric Ligands on Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Molecular Pharmacology*, 52 (1), 172–179.

Jakubik, J. and El-Fakahany, E. E., 2020. Current Advances in Allosteric Modulation of Muscarinic Receptors. *Biomolecules*, 10 (2), 325.

Jefferis, G. S. X. E., 2005. Insect Olfaction: A Map of Smell in the Brain. *Current Biology*, 15 (17), R668–R670.

Jeger, M. J., 2020. The Epidemiology of Plant Virus Disease: Towards a New Synthesis. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9 (12).

Jeyaprakasam, N. K., Liew, J. W. K., Low, V. L., Wan-Sulaiman, W.-Y. and Vythilingam, I., 2020. Plasmodium knowlesi infecting humans in Southeast Asia: What's next? *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14 (12), e0008900.

Jones, A. K., Goven, D., Froger, J.-A., Bantz, A. and Raymond, V., 2021. The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamilies of the cockroaches Blattella germanica and Periplaneta americana. *Pest Management Science*, 77 (8), 3787–3799.

Jones, C. M., Liyanapathirana, M., Agossa, F. R., Weetman, D., Ranson, H., Donnelly, M. J. and Wilding, C. S., 2012. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of Anopheles gambiae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (17), 6614–6619.

Jones, S. W. and Sumikawa, K., 1981. Quinuclidinyl Benzilate Binding in House Fly Heads and Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, 36 (2), 454–459.

Judge, S. and Leitch, B., 1999. Modulation of transmitter release from the locust forewing stretch receptor neuron by GABAergic interneurons activated via muscarinic receptors. *Journal of Neurobiology*, 40 (3), 420–431.

Jurat-Fuentes, J. L., Heckel, D. G. and Ferré, J., 2021. Mechanisms of Resistance to Insecticidal Proteins from Bacillus thuringiensis. *Annual Review of Entomology*, 66 (1), 121–140.

Kameyama, K., Haga, K., Haga, T., Kontani, K., Katada, T. and Fukada, Y., 1993. Activation by G protein beta gamma subunits of beta-adrenergic and muscarinic receptor kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (11), 7753–7758.

Kano, H., Toyama, Y., Imai, S., Iwahashi, Y., Mase, Y., Yokogawa, M., Osawa, M. and Shimada, I., 2019. Structural mechanism underlying G protein family-specific regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel. *Nature Communications*, 10 (1), 2008.

Kiely, A., Authier, A., Kralicek, A. V., Warr, C. G. and Newcomb, R. D., 2007. Functional analysis of a Drosophila melanogaster olfactory receptor expressed in Sf9 cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 159 (2), 189–194.

Kim, Y. H., Kwon, D. H., Ahn, H. M., Koh, Y. H. and Lee, S. H., 2014. Induction of soluble AChE expression via alternative splicing by chemical stress in Drosophila melanogaster. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 48, 75–82.

Kim, Y.-M. and Benovic, J. L., 2002. Differential Roles of Arrestin-2 Interaction with Clathrin and Adaptor Protein 2 in G Protein-coupled Receptor Trafficking*. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (34), 30760–30768.

Koch, W. J., Hawes, B. E., Allen, L. F. and Lefkowitz, R. J., 1994. Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (26), 12706–12710.

van Koppen, C. J. and Kaiser, B., 2003. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacology & Therapeutics*, 98 (2), 197–220.

Krause, A. F., Winkler, A. and Dürr, V., 2013. Central drive and proprioceptive control of antennal movements in the walking stick insect. *Journal of Physiology-Paris*, 107 (1), 116–129.

Kruse, A. C., Hu, J., Pan, A. C., Arlow, D. H., Rosenbaum, D. M., Rosemond, E., Green, H. F., Liu, T., Chae, P. S., Dror, R. O., Shaw, D. E., Weis, W. I., Wess, J. and Kobilka, B. K., 2012. Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 482 (7386), 552–556.

Kruse, A. C., Kobilka, B. K., Gautam, D., Sexton, P. M., Christopoulos, A. and Wess, J., 2014. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13 (7), 549–560.

Kruse, A. C., Ring, A. M., Manglik, A., Hu, J., Hu, K., Eitel, K., Hübner, H., Pardon, E., Valant, C., Sexton, P. M., Christopoulos, A., Felder, C. C., Gmeiner, P., Steyaert, J., Weis, W. I., Garcia, K. C., Wess, J. and Kobilka, B. K., 2013. Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 504 (7478), 101–106.

Kukkonen, J. P., Näsman, J., Ojala, P., Oker-Blom, C. and Akerman, K. E., 1996. Functional properties of muscarinic receptor subtypes Hm1, Hm3 and Hm5 expressed in Sf9 cells using the baculovirus expression system. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 279 (2), 593–601.

Kukkonen, J. P., Näsman, J., Rinken, A., Dementjev, A. and Åkerman, K. E. O., 1998. Pseudo-Noncompetitive Antagonism of M1, M3, and M5Muscarinic Receptor-Mediated Ca2+Mobilization by Muscarinic Antagonists. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243 (1), 41–46.

Kunapuli, P., Onorato, J. J., Hosey, M. M. and Benovic, J. L., 1994. Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (2), 1099–1105.

Kunysz, E. A., Michel, A. D., Whiting, R. L. and Woods, K., 1989. The human astrocytoma cell line 1321 N1 contains M2-glandular type muscarinic receptors linked to phosphoinositide turnover. *British Journal of Pharmacology*, 96 (2), 271–278.

Kwong, T. C., 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24 (1), 144–149.

Lakwo, T., Oguttu, D., Ukety, T., Post, R. and Bakajika, D., 2020. Onchocerciasis Elimination: Progress and Challenges. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 11, 81–95.

Lambert, L., Dubayle, D., Fafouri, A., Herzog, E., Csaba, Z., Dournaud, P., El Mestikawy, S. and Bernard, V., 2018. Endocytosis of Activated Muscarinic m2 Receptor (m2R) in Live Mouse Hippocampal Neurons Occurs via a Clathrin-Dependent Pathway. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12.

Lamberth, C., Jeanmart, S., Luksch, T. and Plant, A., 2013. Current Challenges and Trends in the Discovery of Agrochemicals. *Science*, 341 (6147), 742–746.

Landmann, F., 2019. The Wolbachia Endosymbionts. *Microbiology Spectrum*, 7 (2).

Lanzafame, A. A., Christopoulos, A. and Mitchelson, F., 2003. Cellular Signaling Mechanisms for Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Receptors and Channels*, 9 (4), 241–260.

Laroche, M., Raoult, D. and Parola, P., 2018. Insects and the Transmission of Bacterial Agents. *Microbiology Spectrum*, 6 (5), 6.5.10.

Lavialle-Defaix, C., Apaire-Marchais, V., Legros, C., Pennetier, C., Mohamed, A., Licznar, P., Corbel, V. and Lapied, B., 2011. Anopheles gambiae mosquito isolated neurons: A new biological model for optimizing insecticide/repellent efficacy. *Journal of Neuroscience Methods*, 200 (1), 68–73.

Lavialle-Defaix, C., Moignot, B., Legros, C. and Lapied, B., 2010. How Does Calcium-Dependent Intracellular Regulation of Voltage-Dependent Sodium Current Increase the Sensitivity to the Oxadiazine Insecticide Indoxacarb Metabolite Decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in Insect Pacemaker Neurons? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333 (1), 264–272.

Lazareno, S., Doležal, V., Popham, A. and Birdsall, N. J. M., 2004. Thiochrome Enhances Acetylcholine Affinity at Muscarinic M4 Receptors: Receptor Subtype Selectivity via Cooperativity Rather than Affinity. *Molecular Pharmacology*, 65 (1), 257–266.

Le Corronc, H. and Hue, B., 1993. Pharmacological and Electrophysiological Characterization of a Postsynaptic Muscarinic Receptor in the Central Nervous System of the Cockroach. *Journal of Experimental Biology*, 181 (1), 257–278.

Le Corronc, H., Lapied, B. and Hue, B., 1991. M2-like presynaptic receptors modulate acetylcholine release in the cockroach (Periplaneta americana) central nervous system. *Journal of Insect Physiology*, 37 (9), 647–652.

Leal, W. S., 2013. Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. *Annual Review of Entomology*, 58 (1), 373–391.

Lee, K. B., Pals-Rylaarsdam, R., Benovic, J. L. and Hosey, M. M., 1998. Arrestin-independent Internalization of the m1, m3, and m4 Subtypes of Muscarinic Cholinergic Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (21), 12967–12972.

Legeay, S., Clere, N., Apaire-Marchais, V., Faure, S. and Lapied, B., 2018. Unusual modes of action of the repellent DEET in insects highlight some human side effects. *European Journal of Pharmacology*, 825, 92–98.

Leitch, B. and Pitman, R. M., 1995. Modulation of transmitter release from the terminals of the locust wing stretch receptor neuron by muscarinic antagonists. *Journal of Neurobiology*, 28 (4), 455–464.

Li, J., Shao, Y., Ding, Z., Bao, H., Liu, Z., Han, Z. and Millar, N. S., 2010. Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 40 (1), 17–22.

Li, L., Homan, K. T., Vishnivetskiy, S. A., Manglik, A., Tesmer, J. J. G., Gurevich, V. V. and Gurevich, E. V., 2015. G Protein-coupled Receptor Kinases of the GRK4 Protein Subfamily Phosphorylate Inactive G Protein-coupled Receptors (GPCRs). *Journal of Biological Chemistry*, 290 (17), 10775–10790.

Li, M., Li, H., Sheng, R.-C., Sun, H., Sun, S.-H. and Chen, F.-M., 2020. The First Record of Monochamus saltuarius (Coleoptera; Cerambycidae) as Vector of Bursaphelenchus xylophilus and Its New Potential Hosts in China. *Insects*, 11 (9), 636.

Licznar, P., List, O., Goven, D., Ndong Nna, R., Lapied, B. and Apaire-Marchais, V., 2014. A novel method using Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus for increasing the sensitivity of insecticide through calcium influx in insect cell line. *Journal of Virological Methods*, 195, 72–75.

Lindner, M., Leitner, M. G., Halaszovich, C. R., Hammond, G. R. V. and Oliver, D., 2011. Probing the regulation of TASK potassium channels by PI(4,5)P2 with switchable phosphoinositide phosphatases. *The Journal of Physiology*, 589 (13), 3149–3162.

Liska, D. J., 1998. The detoxification enzyme systems. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 3 (3), 187–198.

List, O., Calas-List, D., Taillebois, E., Juchaux, M., Heuland, E. and Thany, S. H., 2014. Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents. *Journal of Neurochemistry*, 130 (4), 507–513.

Liste, M. J. V., Caltabiano, G., Ward, R. J., Alvarez-Curto, E., Marsango, S. and Milligan, G., 2015. The Molecular Basis of Oligomeric Organization of the Human M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Molecular Pharmacology*, 87 (6), 936–953.

Liu, L. and Rittenhouse, A. R., 2003. Arachidonic acid mediates muscarinic inhibition and enhancement of N-type Ca2+ current in sympathetic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (1), 295–300.

Liu, N., 2015. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annual Review of Entomology*, 60 (1), 537–559.

Liu, N., Li, M., Gong, Y., Liu, F. and Li, T., 2015. Cytochrome P450s – Their expression, regulation, and role in insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 120, 77–81.

Liu, N., Li, T., Wang, Y. and Liu, S., 2021. G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) in Insects—A Potential Target for New Insecticide Development. *Molecules*, 26 (10), 2993.

Liu, N. and Scott, J. G., 1998. Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28 (8), 531–535.

Liu, Z., Williamson, M. S., Lansdell, S. J., Denholm, I., Han, Z. and Millar, N. S., 2005. A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in Nilaparvata lugens (brown planthopper). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102 (24), 8420–8425.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. *Methods*, 25 (4), 402–408.

Logothetis, D. E., Petrou, V. I., Zhang, M., Mahajan, R., Meng, X.-Y., Adney, S. K., Cui, M. and Baki, L., 2015. Phosphoinositide Control of Membrane Protein Function: A Frontier Led by Studies on Ion Channels. *Annual Review of Physiology*, 77 (1), 81–104.

Lopez-Ilasaca, M., Crespo, P., Pellici, P. G., Gutkind, J. S. and Wetzker, R., 1997. Linkage of G Protein-Coupled Receptors to the MAPK Signaling Pathway Through PI 3-Kinase γ. *Science*, 275 (5298), 394–397.

Loudon, R. P. and Benovic, J. L., 1994. Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK6. *Journal of Biological Chemistry*, 269 (36), 22691–22697.

Lü, S.-M., Jiang, M., Tian, X., Hong, S., Zhang, J. and Zhang, Y., 2020. Characterization of an A-Type Muscarinic Acetylcholine Receptor and Its Possible Non-neuronal Role in the Oriental Armyworm, Mythimna separata Walker (Lepidoptera: Noctuidae). *Frontiers in Physiology*, 11.

Lü, S.-M., Zhao, Z., Li, K., Zhang, Y.-L. and Xi, G.-S., 2011. Cloning and expression analysis of a muscarinic cholinergic receptor from the brain of ant, Polyrhachis vicina. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 78 (1), 46–60.

Lu, X.-P., Xu, L., Meng, L.-W., Wang, L.-L., Niu, J. and Wang, J.-J., 2020. Divergent molecular evolution in glutathione S-transferase conferring malathion resistance in the oriental fruit fly, Bactrocera dorsalis (Hendel). *Chemosphere*, 242, 125203.

Luo, J., Busillo, J. M. and Benovic, J. L., 2008. M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor-Mediated Signaling Is Regulated by Distinct Mechanisms. *Molecular Pharmacology*, 74 (2), 338–347.

Maeda, S., Qu, Q., Robertson, M. J., Skiniotis, G. and Kobilka, B. K., 2019. Structures of the M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor/G-protein complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 364 (6440), 552–557.

Malloy, C. A., Somasundaram, E., Omar, A., Bhutto, U., Medley, M., Dzubuk, N. and Cooper, R. L., 2019. Pharmacological identification of cholinergic receptor subtypes: modulation of locomotion and neural circuit excitability in Drosophila larvae. *Neuroscience*, 411, 47–64.

Mancini, M. V., Herd, C. S., Ant, T. H., Murdochy, S. M. and Sinkins, S. P., 2020. Wolbachia strain wAu efficiently blocks arbovirus transmission in Aedes albopictus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14 (3).

Marlo, J. E., Niswender, C. M., Days, E. L., Bridges, T. M., Xiang, Y., Rodriguez, A. L., Shirey, J. K., Brady, A. E., Nalywajko, T., Luo, Q., Austin, C. A., Williams, M. B., Kim, K., Williams, R., Orton, D., Brown, H. A., Lindsley, C. W., Weaver, C. D. and Conn, P. J., 2009. Discovery and Characterization of Novel Allosteric Potentiators of M1 Muscarinic Receptors Reveals Multiple Modes of Activity. *Molecular Pharmacology*, 75 (3), 577–588.

Marsango, S., Ward, R. J., Alvarez-Curto, E. and Milligan, G., 2018. Muscarinic receptor oligomerization. *Neuropharmacology*, 136, 401–410.

Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Bergé, J. B., Devonshire, A. L., Guillet, P., Pasteur, N. and Pauron, D., 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s. *Insect Molecular Biology*, 7 (2), 179–184.

Mburu, M. M., Mweresa, C. K., Omusula, P., Hiscox, A., Takken, W. and Mukabana, W. R., 2017. 2-Butanone as a carbon dioxide mimic in attractant blends for the Afrotropical malaria mosquitoes Anopheles gambiae and Anopheles funestus. *Malaria Journal*, 16 (1), 351.

Michal, P., El-Fakahany, E. E. and Doležal, V., 2007. Muscarinic M2 Receptors Directly Activate Gq/11 and Gs G-Proteins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 320 (2), 607–614.

Michal, P., Lysíková, M. and Tuček, S., 2001. Dual effects of muscarinic M2 acetylcholine receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: dependence on time, receptor density and receptor agonists. *British Journal of Pharmacology*, 132 (6), 1217–1228.

Mikoshiba, K., 2015. Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases. *Advances in Biological Regulation*, 57, 217–227.

Millar, N. S., Baylis, H. A., Reaper, C., Bunting, R., Mason, W. T. and Sattelle, D. B., 1995. Functional expression of a cloned Drosophila muscarinic acetylcholine receptor in a stable Drosophila cell line. *Journal of Experimental Biology*, 198 (9), 1843–1850.

Mittal, P. K., 2003. Biolarvicides in vector control : challenges and prospects, 13.

Mongin, E., Louis, C., Holt, R. A., Birney, E. and Collins, F. H., 2004. The Anopheles gambiae genome: an update. *Trends in Parasitology*, 20 (2), 49–52.

Montella, I. R., Schama, R. and Valle, D., 2012. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107 (4), 437–449.

Moreau, E., Mikulska-Ruminska, K., Goulu, M., Perrier, S., Deshayes, C., Stankiewicz, M., Apaire-Marchais, V., Nowak, W. and Lapied, B., 2020. Orthosteric muscarinic receptor activation by the insect repellent IR3535 opens new prospects in insecticide-based vector control. *Scientific Reports*, 10 (1), 6842.

Mullen, G. R., 2019. *Medical and veterinary entomology*. 3rd edition. San Diego, CA: Elsevier.

Murillo, L., Hamon, A., Es-Salah-Lamoureux, Z., Itier, V., Quinchard, S. and Lapied, B., 2011. Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells. *NeuroToxicology*, 32 (6), 828–835.

Nakajima, K. and Wess, J., 2012. Design and Functional Characterization of a Novel, Arrestin-Biased Designer G Protein-Coupled Receptor. *Molecular Pharmacology*, 82 (4), 575–582.

Naqqash, M. N., Gökçe, A., Bakhsh, A. and Salim, M., 2016. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitology Research*, 115 (4), 1363–1373.

Nenasheva, T. A., Neary, M., Mashanov, G. I., Birdsall, N. J. M., Breckenridge, R. A. and Molloy, J. E., 2013. Abundance, distribution, mobility and oligomeric state of M2 muscarinic acetylcholine receptors in live cardiac muscle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 57, 129–136.

Nishimura, A., Kitano, K., Takasaki, J., Taniguchi, M., Mizuno, N., Tago, K., Hakoshima, T. and Itoh, H., 2010. Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (31), 13666–13671.

Niwa, Y., Kanda, G. N., Yamada, R. G., Shi, S., Sunagawa, G. A., Ukai-Tadenuma, M., Fujishima, H., Matsumoto, N., Masumoto, K., Nagano, M., Kasukawa, T., Galloway, J., Perrin, D., Shigeyoshi, Y., Ukai, H., Kiyonari, H., Sumiyama, K. and Ueda, H. R., 2018. Muscarinic Acetylcholine Receptors Chrm1 and Chrm3 Are Essential for REM Sleep. *Cell Reports*, 24 (9), 2231-2247.e7.

Nkya, T. E., Poupardin, R., Laporte, F., Akhouayri, I., Mosha, F., Magesa, S., Kisinza, W. and David, J.-P., 2014. Impact of agriculture on the selection of insecticide resistance in the malaria vector Anopheles gambiae: a multigenerational study in controlled conditions. *Parasites & Vectors*, 7, 480.

Oakeshott, J. G., Devonshire, A. L., Claudianos, C., Sutherland, T. D., Horne, I., Campbell, P. M., Ollis, D. L. and Russell, R. J., 2005. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin- and carboxyl-esterases. *Chemico-Biological Interactions*, 157–158, 269–275.

Ockenga, W. and Tikkanen, R., 2015. Revisiting the Endocytosis of the M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Membranes*, 5 (2), 197–213.

Okada, J., Morimoto, Y. and Toh, Y., 2009. Antennal motor activity induced by pilocarpine in the American cockroach. *Journal of Comparative Physiology A*, 195 (4), 351–363.

Olianas, M. C., Ingianni, A. and Onali, P., 1998. Role of G Protein βγ Subunits in Muscarinic Receptor-Induced Stimulation and Inhibition of Adenylyl Cyclase Activity in Rat Olfactory Bulb. *Journal of Neurochemistry*, 70 (6), 2620–2627.

OMS, 2009. *Operational guidelines on plague surveillance, diagnosis, prevention and control*.

OMS, 2014. *Module de formation sur l'entomologie du paludisme et lutte antivectorielle*.

OMS, 2016. *World Malaria Report 2015*. World Health Organization.

OMS, 2017. Action mondial pour lutter contre les vecteurs 2016–2030.

OMS, 2019. *Elimination of human onchocerciasis: progress report, 2018–2019*.

OMS, 2020a. *Global programme to eliminate lymphatic filariasis: progress report, 2019*.

OMS, 2020b. *World malaria report*.

OMS, 2021a. *Dengue and severe dengue*.

OMS, 2021b. *Chagas (maladie de, trypanosomiase américaine)*.

OMS, 2021c. *WHO Guidelines for malaria*.

Onai, T., FitzGerald, M. G., Arakawa, S., Gocayne, J. D., Urquhart, D. A., Hall, L. M., Fraser, C. M., McCombie, W. R. and Venter, J. C., 1989. Cloning, sequence analysis and chromosome localization of a Drosophila muscarinic acetylcholine receptor. *FEBS Letters*, 255 (2), 219–225.

Onali, P. and Olianas, M. C., 1995. Bimodal regulation of cyclic AMP by muscarinic receptors. Involvement of multiple G proteins and different forms of adenylyl cyclase. *Life Sciences*, 56 (11), 973–980.

Orr, N., Orr, G. L. and Hollingworth, R. M., 1992. The Sf9 cell line as a model for studying insect octopamine-receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22 (6), 591–597.

Ortelli, F., Rossiter, L. C., Vontas, J., Ranson, H. and Hemingway, J., 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector Anopheles gambiae. *The Biochemical Journal*, 373 (Pt 3), 957–963.

Osimitz, T. G., Murphy, J. V., Fell, L. A. and Page, B., 2010. Adverse events associated with the use of insect repellents containing N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56 (1), 93–99.

Ozoe, Y., 2021. Ion channels and G protein-coupled receptors as targets for invertebrate pest control: from past challenges to practical insecticides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 85 (7), 1563–1571.

Pals-Rylaarsdam, R. and Hosey, M. M., 1997. Two Homologous Phosphorylation Domains Differentially Contribute to Desensitization and Internalization of the m2 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (22), 14152–14158.

Patowary, S., Alvarez-Curto, E., Xu, T.-R., Holz, J. D., Oliver, J. A., Milligan, G. and Raicu, V., 2013. The muscarinic M3 acetylcholine receptor exists as two differently sized complexes at the plasma membrane. *Biochemical Journal*, 452 (2), 303–312.

Pediani, J. D., Ward, R. J., Godin, A. G., Marsango, S. and Milligan, G., 2016. Dynamic Regulation of Quaternary Organization of the M1 Muscarinic Receptor by Subtype-selective Antagonist Drugs. *Journal of Biological Chemistry*, 291 (25), 13132–13146.

Perilla-Henao, L. M. and Casteel, C. L., 2016. Vector-Borne Bacterial Plant Pathogens: Interactions with Hemipteran Insects and Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7.

Perry, T., Chen, W., Ghazali, R., Yang, Y. T., Christesen, D., Martelli, F., Lumb, C., Bao Luong, H. N., Mitchell, J., Holien, J. K., Parker, M. W., Sparks, T. C. and Batterham, P., 2021. Role of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the mode of action of neonicotinoid, sulfoximine and spinosyn insecticides in Drosophila melanogaster. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 131, 103547.

Pietrantonio, P. V., Xiong, C., Nachman, R. J. and Shen, Y., 2018. G protein-coupled receptors in arthropod vectors: omics and pharmacological approaches to elucidate ligand-receptor interactions and novel organismal functions. *Current Opinion in Insect Science*, 29, 12–20.

Pignatelli, P., Ingham, V. A., Balabanidou, V., Vontas, J., Lycett, G. and Ranson, H., 2018. The Anopheles gambiae ATP-binding cassette transporter family: phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 27 (1), 110–122.

Pike, A. and Dimopoulos, G., 2018. Genetic modification of Anopheles stephensi for resistance to multiple Plasmodium falciparum strains does not influence susceptibility to o'nyong'nyong virus or insecticides, or Wolbachia-mediated resistance to the malaria parasite. *PLoS ONE*, 13 (4).

Pitman, R. M., 1971. Transmitter substances in insects: A review. *Comparative and General Pharmacology*, 2 (7), 347–371.

Pitti Caballero, J., Murillo, L., List, O., Bastiat, G., Flochlay-Sigognault, A., Guerino, F., Lefrançois, C., Lautram, N., Lapied, B. and Apaire-Marchais, V., 2019. Nanoencapsulated deltamethrin as synergistic agent potentiates insecticide effect of indoxacarb through an unusual neuronal calcium-dependent mechanism. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 157, 1–12.

Poulin, B., Butcher, A., McWilliams, P., Bourgognon, J.-M., Pawlak, R., Kong, K. C., Bottrill, A., Mistry, S., Wess, J., Rosethorne, E. M., Charlton, S. J. and Tobin, A. B., 2010. The M3-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (20), 9440–9445.

Poupardin, R., Srisukontarat, W., Yunta, C. and Ranson, H., 2014. Identification of Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance in the Dengue Vector Aedes aegypti. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8 (3).

Qazi, S., Proulx, D. and Trimmer, B. A., 1996. Characterization of muscarinic binding sites in the central nervous system of larval Manduca sexta. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26 (7), 721–732.

Qin, B., Humberg, T.-H., Kim, A., Kim, H. S., Short, J., Diao, F., White, B. H., Sprecher, S. G. and Yuan, Q., 2019. Muscarinic acetylcholine receptor signaling generates OFF selectivity in a simple visual circuit. *Nature Communications*, 10.

Qiu, Y., Tittiger, C., Wicker-Thomas, C., Goff, G. L., Young, S., Wajnberg, E., Fricaux, T., Taquet, N., Blomquist, G. J. and Feyereisen, R., 2012. An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (37), 14858–14863.

Raymond, V., Goven, D., Benzidane, Y., List, O. and Lapied, B., 2017. Influence of cellular and molecular factors on membrane target sensitivity to insecticides. *Current Medicinal Chemistry*, 24 (999), 1–1.

Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B. M., Rauh, J. J. and Sattelle, D. B., 2005. Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience*, 5 (3), 119–133.

Raymond-Delpech, V., Towers, P. R. and Sattelle, D. B., 2004. Gene silencing of selected calcium-signalling molecules in a Drosophila cell line using double-stranded RNA interference. *Cell Calcium*, 35 (2), 131–139.

Reiner, C. and Nathanson, N. M., 2012. Muscarinic Receptor Trafficking. *In*: Fryer, A. D., Christopoulos, A., and Nathanson, N. M., eds. *Muscarinic Receptors*. Berlin, Heidelberg: Springer, 61–78.

Ren, G. R., Folke, J., Hauser, F., Li, S. and Grimmelikhuijzen, C. J. P., 2015. The A- and B-type muscarinic acetylcholine receptors from Drosophila melanogaster couple to different second messenger pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462 (4), 358–364.

Rhee, S. G. and Bae, Y. S., 1997. Regulation of Phosphoinositide-specific Phospholipase C Isozymes . *Journal of Biological Chemistry*, 272 (24), 15045–15048.

Richardson, R. M., Kim, C., Benovic, J. L. and Hosey, M. M., 1993. Phosphorylation and desensitization of human m2 muscarinic cholinergic receptors by two isoforms of the beta-adrenergic receptor kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (18), 13650–13656.

Riddick, E. W., 2017. Identification of Conditions for Successful Aphid Control by Ladybirds in Greenhouses. *Insects*, 8 (2).

Rinkevich, F. D., Du, Y. and Dong, K., 2013. Diversity and Convergence of Sodium Channel Mutations Involved in Resistance to Pyrethroids. *Pesticide biochemistry and physiology*, 106 (3), 93–100.

Rivas-Ramírez, P., Cadaveira-Mosquera, A., Lamas, J. A. and Reboreda, A., 2015. Muscarinic modulation of TREK currents in mouse sympathetic superior cervical ganglion neurons. *European Journal of Neuroscience*, 42 (2), 1797–1807.

Roberts-Crowley, M. L., Mitra-Ganguli, T., Liu, L. and Rittenhouse, A. R., 2009. Regulation of voltage-gated Ca2+ channels by lipids. *Cell Calcium*, 45 (6), 589–601.

Rosenblum, K., Futter, M., Jones, M., Hulme, E. C. and Bliss, T. V. P., 2000. ERKI/II Regulation by the Muscarinic Acetylcholine Receptors in Neurons. *Journal of Neuroscience*, 20 (3), 977–985.

Rozenfeld, E., Lerner, H. and Parnas, M., 2019. Muscarinic Modulation of Antennal Lobe GABAergic Local Neurons Shapes Odor Coding and Behavior. *Cell Reports*, 29 (10), 3253-3265.e4.

Rushton, Macchioni, F., Chelucci, L. and Torracca, B., 2015. Economic impact of Bluetongue: a review of the effects on production. *Veterinaria Italiana*, 51 (4), 401–406.

Ryckebusch, S. and Laurent, G., 1993. Rhythmic patterns evoked in locust leg motor neurons by the muscarinic agonist pilocarpine. *Journal of Neurophysiology*, 69 (5), 1583–1595.

Sachse, S., Peele, P., Silbering, A. F., Gühmann, M. and Galizia, C. G., 2006. Role of histamine as a putative inhibitory transmitter in the honeybee antennal lobe. *Frontiers in Zoology*, 3 (1), 22.

Santé Publique France, 2020. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 19 mai 2020, n°Hors-série Recommandations sanitaires pour les voyageurs, 2020 (à l'attention des professionnels de santé)*.

Santiago, L. J. and Abrol, R., 2019. Understanding G Protein Selectivity of Muscarinic Acetylcholine Receptors Using Computational Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (21).

Sattelle, D. B., Jones, A. K., Sattelle, B. M., Matsuda, K., Reenan, R. and Biggin, P. C., 2005. Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of Drosophila melanogaster. *BioEssays*, 27 (4), 366–376.

Savva, Y. A., Rieder, L. E. and Reenan, R. A., 2012. The ADAR protein family. *Genome Biology*, 13 (12), 252.

Schmidt, L. S., Thomsen, M., Weikop, P., Dencker, D., Wess, J., Woldbye, D. P. D., Wortwein, G. and Fink-Jensen, A., 2011. Increased cocaine self-administration in M4 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Psychopharmacology*, 216 (3), 367–378.

Schneider, E. H. and Seifert, R., 2010. Sf9 cells: a versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 128 (3), 387–418.

Scholthof, K.-B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C. and Foster, G. D., 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12 (9), 938–954.

Seeger, T., Fedorova, I., Zheng, F., Miyakawa, T., Koustova, E., Gomeza, J., Basile, A. S., Alzheimer, C. and Wess, J., 2004. M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor Knock-Out Mice Show Deficits in Behavioral Flexibility, Working Memory, and Hippocampal Plasticity. *Journal of Neuroscience*, 24 (45), 10117–10127.

Servent, D., Blanchet, G., Mourier, G., Marquer, C., Marcon, E. and Fruchart-Gaillard, C., 2011. Muscarinic toxins. *Toxicon*, 58 (6), 455–463.

Servent, D. and Fruchart-Gaillard, C., 2009. Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *Journal of Neurochemistry*, 109 (5), 1193–1202.

Shah, M. M., Migliore, M., Valencia, I., Cooper, E. C. and Brown, D. A., 2008. Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (22), 7869–7874.

Shapiro, R. A., Wakimoto, B. T., Subers, E. M. and Nathanson, N. M., 1989. Characterization and functional expression in mammalian cells of genomic and cDNA clones encoding a Drosophila muscarinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (22), 9039–9043.

Sharakhova, M. V., Hammond, M. P., Lobo, N. F., Krzywinski, J., Unger, M. F., Hillenmeyer, M. E., Bruggner, R. V., Birney, E. and Collins, F. H., 2007. Update of the Anopheles gambiae PEST genome assembly. *Genome Biology*, 8 (1), R5.

Shen, W., Hamilton, S. E., Nathanson, N. M. and Surmeier, D. J., 2005. Cholinergic Suppression of KCNQ Channel Currents Enhances Excitability of Striatal Medium Spiny Neurons. *Journal of Neuroscience*, 25 (32), 7449–7458.

Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A. and Stanaway, J. D., 2016. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 16 (8), 935–941.

Shivnaraine, R. V., Fernandes, D. D., Ji, H., Li, Y., Kelly, B., Zhang, Z., Han, Y. R., Huang, F., Sankar, K. S., Dubins, D. N., Rocheleau, J. V., Wells, J. W. and Gradinaru, C. C., 2016. Single-Molecule Analysis of the Supramolecular Organization of the M2 Muscarinic Receptor and the Gαi1 Protein. *Journal of the American Chemical Society*, 138 (36), 11583–11598.

Sick, F., Beer, M., Kampen, H. and Wernike, K., 2019. Culicoides Biting Midges—Underestimated Vectors for Arboviruses of Public Health and Veterinary Importance. *Viruses*, 11 (4), 376.

Silva, B., Molina-Fernández, C., Ugalde, M. B., Tognarelli, E. I., Angel, C. and Campusano, J. M., 2015. *Muscarinic ACh Receptors Contribute to Aversive Olfactory Learning in Drosophila*.

Simoni, A., Hammond, A. M., Beaghton, A. K., Galizi, R., Taxiarchi, C., Kyrou, K., Meacci, D., Gribble, M., Morselli, G., Burt, A., Nolan, T. and Crisanti, A., 2020. A male-biased sex-distorter gene drive for the human malaria vector Anopheles gambiae. *Nature Biotechnology*, 38 (9), 1054–1060.

Soderlund, D. M., 2012. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*, 86 (2), 165–181.

Sogorb, M. A. and Vilanova, E., 2002. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology Letters*, 128 (1), 215–228.

Sohn, J.-W., Lim, A., Lee, S.-H. and Ho, W.-K., 2007. Decrease in PIP2–channel interactions is the final common mechanism involved in PKC- and arachidonic acid-mediated inhibitions of GABAB-activated K+ current. *The Journal of Physiology*, 582 (3), 1037–1046.

Staus, D. P., Hu, H., Robertson, M. J., Kleinhenz, A. L. W., Wingler, L. M., Capel, W. D., Latorraca, N. R., Lefkowitz, R. J. and Skiniotis, G., 2020. Structure of the M2 muscarinic receptor–β-arrestin complex in a lipid nanodisc. *Nature*, 579 (7798), 297–302.

Steidl, S. and Yeomans, J. S., 2009. M5 Muscarinic Receptor Knockout Mice Show Reduced Morphine-Induced Locomotion but Increased Locomotion after Cholinergic Antagonism in the Ventral Tegmental Area. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 328 (1), 263–275.

Suh, B.-C., Leal, K. and Hille, B., 2010. Modulation of High-Voltage Activated Ca2+ Channels by Membrane Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *Neuron*, 67 (2), 224–238.

Sun, H., Du, Y., Liu, Z. and Dong, K., 2019. Distinct functional properties of sodium channel variants are associated with usage of alternative exons in Nilaparvata lugens. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 118, 103292.

Sun, H., Liu, Y., Li, J., Cang, X., Bao, H. and Liu, Z., 2017. The potential subunits involved in two subtypes of α-Bgt-resistant nAChRs in cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 81, 32–40.

Sunahara, R. K. and Taussig, R., 2002. Isoforms of Mammalian Adenylyl Cyclase: Multiplicities of Signaling. *Molecular Interventions*, 2 (3), 168.

Swale, D. R., 2019. Perspectives on new strategies for the identification and development of insecticide targets. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 161, 23–32.

Swale, D. R., Sun, B., Tong, F. and Bloomquist, J. R., 2014. Neurotoxicity and Mode of Action of N, N-Diethyl-Meta-Toluamide (DEET). *PLoS ONE*, 9 (8), e103713.

Syrovatkina, V., Alegre, K. O., Dey, R. and Huang, X.-Y., 2016. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 428 (19), 3850–3868.

Szewczyk, B., Hoyos-Carvajal, L., Paluszek, M., Skrzecz, I. and Lobo de Souza, M., 2006. Baculoviruses — re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*, 24 (2), 143–160.

Tan, J., Liu, Z., Nomura, Y., Goldin, A. L. and Dong, K., 2002. Alternative Splicing of an Insect Sodium Channel Gene Generates Pharmacologically Distinct Sodium Channels. *Journal of Neuroscience*, 22 (13), 5300–5309.

Taylor, M. J., Hoerauf, A. and Bockarie, M., 2010. Lymphatic filariasis and onchocerciasis. *The Lancet*, 376 (9747), 1175–1185.

Taylor-Wells, J., Senan, A., Bermudez, I. and Jones, A. K., 2018. Species specific RNA A-to-I editing of mosquito RDL modulates GABA potency and influences agonistic, potentiating and antagonistic actions of ivermectin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 93, 1–11.

Tennakoon, M., Senarath, K., Kankanamge, D., Ratnayake, K., Wijayaratna, D., Olupothage, K., Ubeysinghe, S., Martins-Cannavino, K., Hébert, T. E. and Karunarathne, A., 2021. Subtype-dependent regulation of Gβγ signalling. *Cellular Signalling*, 82, 109947.

Terazima, E. and Yoshino, M., 2010. Modulatory action of acetylcholine on the Na+-dependent action potentials in Kenyon cells isolated from the mushroom body of the cricket brain. *Journal of Insect Physiology*, 56 (12), 1746–1754.

Thal, D. M., Sun, B., Feng, D., Nawaratne, V., Leach, K., Felder, C. C., Bures, M. G., Evans, D. A., Weis, W. I., Bachhawat, P., Kobilka, T. S., Sexton, P. M., Kobilka, B. K. and Christopoulos, A., 2016. Crystal Structures of the M1 and M4 Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Nature*, 531 (7594), 335–340.

Thangaraju, A. and Sawyer, G. W., 2011. Comparison of the kinetics and extent of muscarinic M1–M5 receptor internalization, recycling and downregulation in Chinese hamster ovary cells. *European Journal of Pharmacology*, 650 (2), 534–543.

Thany, S. H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D. B. and Lapied, B., 2007. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 28 (1), 14–22.

Thompson, A. J., Verdin, P. S., Burton, M. J., Davies, T. G. E., Williamson, M. S., Field, L. M., Baines, R. A., Mellor, I. R. and Duce, I. R., 2020. The effects of knock-down resistance mutations and alternative splicing on voltage-gated sodium channels in Musca domestica and Drosophila melanogaster. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 122, 103388.

Thompson, A. K., Mostafapour, S. P., Denlinger, L. C., Bleasdale, J. E. and Fisher, S. K., 1991. The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. A role for Gp in receptor compartmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (35), 23856–23862.

Thomsen, M., Sørensen, G. and Dencker, D., 2018. Physiological roles of CNS muscarinic receptors gained from knockout mice. *Neuropharmacology*, 136, 411–420.

Trimmer, B. A. and Weeks, J. C., 1989. Effects of Nicotinic and Muscarinic Agents on an Identified Motoneurone and its Direct Afferent Inputs in Larval Manduca Sexta. *Journal of Experimental Biology*, 144 (1), 303–337.

Trimmer, B. A. and Weeks, J. C., 1993. Muscarinic acetylcholine receptors modulate the excitability of an identified insect motoneuron. *Journal of Neurophysiology*, 69 (6), 1821–1836.

Turner, J., Hughes, L. F. and Toth, L. A., 2010. Sleep, activity, temperature and arousal responses of mice deficient for muscarinic receptor M2 or M4. *Life Sciences*, 86 (5), 158–169.

Tzavara, E. T., Bymaster, F. P., Davis, R. J., Wade, M. R., Perry, K. W., Wess, J., McKinzie, D. L., Felder, C. and Nomikos, G. G., 2004. M4 muscarinic receptors regulate the dynamics of cholinergic and dopaminergic neurotransmission: relevance to the pathophysiology and treatment of related central nervous system pathologies. *The FASEB Journal*, 18 (12), 1410–1412.

Valant, C., Felder, C. C., Sexton, P. M. and Christopoulos, A., 2012. Probe Dependence in the Allosteric Modulation of a G Protein-Coupled Receptor: Implications for Detection and Validation of Allosteric Ligand Effects. *Molecular Pharmacology*, 81 (1), 41–52.

Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Mavridis, K. and Vontas, J., 2020. Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 69–76.

Vincent, J. F. V. and Wegst, U. G. K., 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure & Development*, 33 (3), 187–199.

Vogel, W. K., Sheehan, D. M. and Schimerlik, M. I., 1997. Site-Directed Mutagenesis on the m2 Muscarinic Acetylcholine Receptor: The Significance of Tyr403 in the Binding of Agonists and Functional Coupling. *Molecular Pharmacology*, 52 (6), 1087–1094.

Vögler, O., Bogatkewitsch, G. S., Wriske, C., Krummenerl, P., Jakobs, K. H. and Koppen, C. J. van, 1998. Receptor Subtype-specific Regulation of Muscarinic Acetylcholine Receptor Sequestration by Dynamin: DISTINCT SEQUESTRATION OF m2 RECEPTORS. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (20), 12155–12160.

Vögler, O., Nolte, B., Voss, M., Schmidt, M., Jakobs, K. H. and Koppen, C. J. van, 1999. Regulation of Muscarinic Acetylcholine Receptor Sequestration and Function by β-Arrestin. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (18), 12333–12338.

Vontas, J., Katsavou, E. and Mavridis, K., 2020. Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in Anopheles and Aedes mosquito vectors: Muddying the waters. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, 104666.

Vozmediano, J. M., Armario, J. C. and Gonzalez-Cabrerizo, A., 2000. Immunologic contact urticaria from diethyltoluamide. *International Journal of Dermatology*, 39 (11), 876–877.

Vuckovic, Z., Gentry, P. R., Berizzi, A. E., Hirata, K., Varghese, S., Thompson, G., Westhuizen, E. T. van der, Burger, W. A. C., Rahmani, R., Valant, C., Langmead, C. J., Lindsley, C. W., Baell, J. B., Tobin, A. B., Sexton, P. M., Christopoulos, A. and Thal, D. M., 2019. Crystal structure of the M5 muscarinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116 (51), 26001–26007.

Wamwiri, F. N. and Changasi, R. E., 2016. Tsetse Flies (Glossina) as Vectors of Human African Trypanosomiasis: A Review. *BioMed Research International*, 2016, e6201350.

Wang, L., Nomura, Y., Du, Y., Liu, N., Zhorov, B. S. and Dong, K., 2015. A mutation in the intracellular loop III/IV of mosquito sodium channel synergizes the effect of mutations in helix IIS6 on pyrethroid resistance. *Molecular Pharmacology*, 87 (3), 421–429.

Warrell, D. A., 2019. Louse-borne relapsing fever (Borrelia recurrentis infection). *Epidemiology & Infection*, 147.

Weaver, S. C., Charlier, C., Vasilakis, N. and Lecuit, M., 2018. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annual Review of Medicine*, 69 (1), 395–408.

Wenzel, B., Elsner, N. and Heinrich, R., 2002. mAChRs in the Grasshopper Brain Mediate Excitation by Activation of the AC/PKA and the PLC Second-Messenger Pathways. *Journal of Neurophysiology*, 87 (2), 876–888.

Wess, J., Eglen, R. M. and Gautam, D., 2007. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6 (9), 721–733.

Wess, J., Maggio, R., Palmer, J. R. and Vogel, Z., 1992. Role of conserved threonine and tyrosine residues in acetylcholine binding and muscarinic receptor activation. A study with m3 muscarinic receptor point mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 267 (27), 19313–19319.

Whitfield, A. E., Falk, B. W. and Rotenberg, D., 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 479–480, 278–289.

Wiles, D., Yee, J., Castillo, U., Russell, J., Spiller, H. and Casavant, M., 2014. A Lethal Case of DEET Toxicity Due to Intentional Ingestion. *Journal of Analytical Toxicology*, 38 (9), 696–698.

Wilson, A. L., Courtenay, O., Kelly-Hope, L. A., Scott, T. W., Takken, W., Torr, S. J. and Lindsay, S. W., 2020. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14 (1).

Windbichler, N., Papathanos, P. A. and Crisanti, A., 2008. Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in Anopheles gambiae. *PLoS genetics*, 4 (12), e1000291.

Winks, J. S., Hughes, S., Filippov, A. K., Tatulian, L., Abogadie, F. C., Brown, D. A. and Marsh, S. J., 2005. Relationship between Membrane Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate and Receptor-Mediated Inhibition of Native Neuronal M Channels. *Journal of Neuroscience*, 25 (13), 3400–3413.

Wu, G., Bogatkevich, G. S., Mukhin, Y. V., Benovic, J. L., Hildebrandt, J. D. and Lanier, S. M., 2000. Identification of Gβγ Binding Sites in the Third Intracellular Loop of the M3-muscarinic Receptor and Their Role in Receptor Regulation *. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (12), 9026–9034.

Xia, R.-Y., Li, M.-Q., Wu, Y.-S., Qi, Y.-X., Ye, G.-Y. and Huang, J., 2016. A new family of insect muscarinic acetylcholine receptors: New family of insect mAChRs. *Insect Molecular Biology*, 25 (4), 362–369.

Yahouédo, G. A., Chandre, F., Rossignol, M., Ginibre, C., Balabanidou, V., Mendez, N. G. A., Pigeon, O., Vontas, J. and Cornelie, S., 2017. Contributions of cuticle permeability and enzyme detoxification to pyrethroid resistance in the major malaria vector Anopheles gambiae. *Scientific Reports*, 7 (1), 11091.

Yamauchi, J., Nagao, M., Kaziro, Y. and Itoh, H., 1997. Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase by Signaling through G Protein-coupled Receptors: INVOLVEMENT OF Gβγ AND Gαq/11 SUBUNITS. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (44), 27771–27777.

Yamauchi, J., Tsujimoto, G., Kaziro, Y. and Itoh, H., 2001. Parallel Regulation of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 3 (MKK3) and MKK6 in Gq-signaling Cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (26), 23362–23372.

Yang, R., 2017. Plague: Recognition, Treatment, and Prevention. *Journal of Clinical Microbiology*, 56 (1), e01519-17.

Yang, S., Yang, S. Y., Zhang, C. P., Wei, J.-N. and Kuang, R. P., 2009. Population dynamics of Myzus persicae on tobacco in Yunnan Province, China, before and after augmentative releases of Aphidius gifuensis. *Biocontrol Science and Technology*, 19 (2), 219–228.

Yeatman, H. R., Lane, J. R., Choy, K. H. C., Lambert, N. A., Sexton, P. M., Christopoulos, A. and Canals, M., 2014. Allosteric Modulation of M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor Internalization and Subcellular Trafficking*. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (22), 15856–15866.

Zamponi, G. W. and Currie, K. P. M., 2013. Regulation of CaV2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828 (7), 1629–1643.

Zenko, D. and Hislop, J. N., 2018. Regulation and trafficking of muscarinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 136, 374–382.

Zenko, D., Thompson, D. and Hislop, J. N., 2020. Endocytic sorting and downregulation of the M2 acetylcholine receptor is regulated by ubiquitin and the ESCRT complex. *Neuropharmacology*, 162, 107828.

Zhang, W., Basile, A. S., Gomeza, J., Volpicelli, L. A., Levey, A. I. and Wess, J., 2002. Characterization of Central Inhibitory Muscarinic Autoreceptors by the Use of Muscarinic Acetylcholine Receptor Knock-Out Mice. *Journal of Neuroscience*, 22 (5), 1709–1717.

Zhang, Y., Wang, X., Yang, B., Hu, Y., Huang, L., Bass, C. and Liu, Z., 2015. Reduction in mRNA and protein expression of a nicotinic acetylcholine receptor α8 subunit is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, Nilaparvata lugens. *Journal of Neurochemistry*, 135 (4), 686–694.

Zhi-Yong Huang and Knowles, C. O., 1990. Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in honey bee (Apis mellifera) brain. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 97 (2), 275–281.

Zhou, Y., Frey, T. K. and Yang, J. J., 2009. Viral calciomics: Interplays between Ca2+ and virus. *Cell Calcium*, 46 (1), 1–17.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS **1**

AVANT-PROPOS **4**

INTRODUCTION **6**

CHAPITRE 1 : MALADIES VECTORIELLES ET LUTTE ANTIVECTORIELLE **6**

1. Maladies vectorielles **6**
1.1. Généralités 6
1.2. Maladies vectorielles en santé des plantes 7
1.3. Maladies vectorielles en santé vétérinaire et humaine 9
1.3.1. Maladie vectorielle virale des vertébrés 9
1.3.2. Maladie vectorielle bactérienne des vertébrés 10
1.3.3. Maladie vectorielle parasitaire des vertébrés 11
2. Lutte antivectorielle **14**
2.1. Lutte biologique 14
2.2. Lutte génétique 15
2.3. Lutte physique 16
2.4. Lutte chimique 17
2.4.1. Molécules utilisées en lutte chimique 17
a) Larvicides 17
b) Adulticides 17
c) Molécules à effet répulsif 18
2.4.2. Mode d'action des insecticides neurotoxiques 18
a) Mode d'action des pyréthrinoïdes et du DDT 18
b) Mode d'action des organophosphorés et des carbamates 19

CHAPITRE 2 : RESISTANCE ET MECANISMES MODULANT LA SENSIBILITE DES CIBLES MOLECULAIRES AUX INSECTICIDES **21**

1. Résistance aux insecticides **21**
1.1. Généralités 21
1.2. Mutations ponctuelles des cibles moléculaires des insecticides 21
1.3. Résistance métabolique 22
1.4. Altération de la pénétration des insecticides au niveau de la cuticule 23
1.5. Séquestration des insecticides 24
1.6. Comportements d'évitement 25
2. Mécanismes modulant la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides **26**
2.1. Mécanismes impactant la structure moléculaire des cibles des insecticides 27
2.1.1. Composition en sous-unités 27
2.1.2. Épissage alternatif 28
2.1.3. Edition d'ARN 28
2.2. Rôle des protéines auxiliaires sur l'efficacité des insecticides 29
2.3. Modulation de la sensibilité des cibles aux insecticides par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation 30
3. Le calcium, un acteur clé dans la mise en place de nouvelles stratégies dans la lutte antivectorielle **33**
3.1. Utilisation de virus d'insectes comme agent synergisant 33
3.2. Utilisation de produits phytosanitaires comme agents synergisants 34

CHAPITRE 3 : RECEPTEURS MUSCARINIQUES : DES RECEPTEURS DE LA FAMILLE DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G **36**

1. Récepteurs muscariniques de mammifères **36**
1.1. Structure moléculaire 36

1.1.1. Structure des récepteurs muscariniques 36
1.1.2. Dimérisation et hétéromérisation des mAChRs 39
1.2. Transduction du signal par les mAChRs dans le système nerveux 40
1.2.1. Voies de signalisation régulées par les sous-unités Gα couplées aux mAChRs 41
1.2.2. Voies de signalisation régulées par les dimères Gβγ couplés aux mAChRs 43
1.2.3. Régulation de canaux ioniques neuronaux par les mAChRs 43
1.2.4. Désensibilisation, internalisation et recyclage des mAChRs 45
1.3. Rôles physiologiques des récepteurs mAChRs 49
1.3.1. Fonction des mAChRs selon leur localisation synaptique 49
1.3.2. Rôles physiologiques des mAChRs neuronaux 51
1.3.3. Pharmacologie des mAChRs de mammifères 53
2. mAChRs d'insectes, des récepteurs méconnus 56
2.1. Aspects moléculaires et pharmacologiques des mAChRs d'insectes 56
2.2. Localisation cellulaire des mAChRs chez les insectes 59
2.3. Rôles physiologiques des mAChRs chez les insectes 59
2.3.1. Rôle des mAChRs dans le système moteur 59
2.3.2. Rôle des mAChRs dans la mémoire et l'apprentissage 60
2.3.3. Rôle des mAChRs dans les systèmes sensoriels 62

OBJECTIFS 64

MATERIELS, METHODES ET MODELES D'ETUDES 65

1. Moustique *Anopheles gambiae* 65
2. Identification des séquences et quantification de l'expression des mAChRs d'*An. gambiae* 67
2.1. Identification et analyse des séquences protéiques des mAChRs dans le génome du moustique *Anopheles gambiae* par analyse bio-informatique 67
2.2. Clonage des différents mAChRs d'*An. gambiae* 67
2.2.1. Amplification par PCR des séquences codantes des mAChRs 67
2.2.2. Purification des amplicons obtenus par PCR 69
2.2.3. Insertion des séquences codantes des mAChRs dans le vecteur de clonage pCR-Blunt 69
2.2.4. Transformation de bactéries compétentes par choc thermique et criblage des clones recombinants . 70
2.2.5. Purification des plasmides recombinés 70
2.3. Quantification de l'expression des ARNm des mAChRs dans les cellules du système nerveux d'anophèle. 71
3. Expression des mAChRs dans un système hétérologue, les cellules *Sf*9 72
3.1. Modèle cellulaire : les cellules *Sf*9 72
3.2. Sous-clonage des séquences des mAChRs dans le vecteur d'expression pIB/V5-His 73
3.3. Culture des cellules *Sf*9 et transfection des cellules avec des vecteurs contenant les séquences des mAChRs 74
3.4. Établissement de lignées stables contenant le plasmide pIB-mAChR-A ou pIB/V5-His 75
4. Caractérisation pharmacologique et fonctionnelle des mAChRs 76
4.1. Etude de la variation de calcium cytoplasmique en réponse à l'activation des récepteurs muscariniques par imagerie calcique 76
4.1.1. Principe de la technique d'imagerie calcique 76
4.1.2. Protocole d'enregistrement de la variation de la concentration en calcium cytoplasmique par imagerie calcique 77
4.1.3. Caractérisation pharmacologique des mAChRs 77
4.1.4. Caractérisation de la voie de signalisation couplée aux mAChRs 78
4.1.5. Analyse des données 78
5. Étude de l'impact de l'activation du mAChR-A sur la sensibilité de l'AChE1 à un organophosphoré 79
5.1. Co-expression du mAChR-A et de l'AChE1 en système hétérologue 79
5.2. Dosage de l'activité de l'AChE selon la méthode d'Ellman 79

RESULTATS 81

1. Identification, analyse et clonage des séquences des récepteurs muscariniques d'anophèles. 81

1.1. Identification des mAChRs dans le protéome d'*An. gambiae* et analyse des séquences prédites 81
1.2. Analyse de la séquence clonée du récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* 82
1.3. Analyse des séquences clonées du récepteur mAChR-B d'*An. gambiae* 84
1.4. Analyse de la séquence clonée du récepteur mAChR-C d'*An. gambiae* 86
2. Analyse de l'expression des transcrits des mAChRs dans les cellules nerveuses 87
3. Étude pharmacologique et fonctionnelle des récepteurs muscariniques de type A et de type C 88
3.1. Expression fonctionnelle des récepteurs mAChR-A et mAChR-C dans des cellules *Sf*9 88
3.2. Pharmacologie du récepteur muscarinique mAChR-A 89
3.3. Identification de la voie de signalisation du récepteur mAChR-A 93
4. L'activation du récepteur mAChR-A d'anophèle peut-elle moduler la sensibilité d'une cible aux insecticides ? 95
4.1. Étude de l'effet des répulsifs DEET et IR3535 sur le récepteur mAChR-A 95
4.2. Impact de l'activation du récepteur mAChR-A sur la sensibilité de l'acétylcholinestérase à un insecticide 97

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 99

1. Discussion 99
2. Conclusions et perspectives 103

BIBLIOGRAPHIE 106

TABLE DES ILLUSTRATIONS 132

TABLE DES TABLEAUX 134

ANNEXE 135

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma récapitulatif des modes de transmission des maladies vectorielles. 6

Figure 2 : Structure moléculaire d'un pyréthrinoïde de type I : la perméthrine, et d'un pyréthrinoïde de type II : la deltaméthrine. 19

Figure 3 : Schéma représentant le mode d'action d'un organophosphoré : le chlorpyrifos, et d'un carbamate : le propoxur. 20

Figure 4 : Schéma récapitulatif des mécanismes cellulaires et moléculaires régulant la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides. 26

Figure 5 : Effets hypothétiques des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation dépendants du calcium sur l'augmentation de la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides. 32

Figure 6 : Schéma représentant la stratégie d'utilisation de virus comme agent synergisant à un insecticide. . 34

Figure 7 : Schéma de la structure d'un récepteur muscarinique. 36

Figure 8 : Schéma comparant la position des segments transmembranaires entre les formes actives et inactives du récepteur muscarinique de sous-type M1 humain. 38

Figure 9 : Schéma représentant les sous-types de mAChRs et les complexes de protéines G hétérotrimériques associés. 40

Figure 10 : Schéma de la voie de signalisation activée par les mAChRs couplés aux protéines $G\alpha_{q/11}$. 42

Figure 11 : Schéma de la voie de signalisation activée par les mAChRs couplés aux protéines $G\alpha_{i/o}$. 42

Figure 12 : Schéma récapitulatif des mécanismes régulant la désensibilisation, l'internalisation, et la « down-régulation » des mAChRs. 48

Figure 13 : Schéma récapitulatif de la fonction des mAChRs dans la synapse glutamatergique. 51

Figure 14 : Schéma représentant le cycle de vie des moustiques femelles. 66

Figure 15 : Photographie de cellules Sf9 72

Figure 16 : Carte du plasmide pIB/V5-His. 73

Figure 17 : Structure de la sonde fluorescente Fura-2AM lorsqu'elle est liée ou non au Ca^{2+} et longueurs d'onde d'émission et d'excitation associées. 76

Figure 18 : Schéma représentant les réactions chimiques ayant lieu lors d'un dosage de l'activité de l'AChE par la méthode d'Ellman. 79

Figure 19 : Schéma de la structure des récepteurs mAChRs *d'An. gambiae* prédite en bio-informatique. 82

Figure 20 : Analyse de la séquence protéique du mAChR-A d'*An. gambiae* traduite à partir de la séquence nucléotidique clonée dans le plasmide pCR-Blunt. 83

Figure 21 : Alignement de la région spécifique des séquences protéiques du récepteur mAChR-A de *D. melanogaster* permettant la distinction entre l'isoforme A, et l'isoforme B avec celle du récepteur mAChR-A d'*An. gambiae.* 83

Figure 22 : Analyse de la séquence protéique du récepteur mAChR-B1 d'*An. gambiae* traduite à partir de la séquence nucléotidique clonée dans le plasmide pCR-Blunt. 85

Figure 23 : Analyse de la séquence protéique du récepteur mAChR-C d'*An. gambiae* traduite à partir de la séquence nucléotidique clonée dans le plasmide pCR-Blunt. 86

Figure 24 : Quantification par qPCR des transcrits codant pour les mAChRs d'*An. gambiae*..... 87

Figure 25 : Analyse des variations de la concentration en calcium intracellulaire dans les cellules *Sf*9 transfectées avec le vecteur pIB-mAChR-A ou pIB/V5-His au cours du temps. 88

Figure 26 : Exemples de tracés représentant la variation du ratio 340nm/380nm au cours du temps après l'application de diverses molécules à la concentration de 10^{-4}M. 89

Figure 27 : Courbes concentration-effet obtenues suite à l'application d'acétylcholine, de muscarine ou d'oxotrémorine M sur le récepteur mAChR-A d'*An. gambiae* exprimé dans des cellules *Sf*9. 90

Figure 28 : Effet de l'atropine (Atr) sur l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'application d'ACh sur des cellules *Sf*9 exprimant le récepteur mAChR-A. 91

Figure 29 : Effet de divers antagonistes sélectifs des mAChRs sur l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'application d'ACh sur des cellules *Sf*9 exprimant le récepteur mAChR-A. 92

Figure 30 : Histogramme représentant l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'application d'ACh (10^{-4}M) en présence de calcium extracellulaire ou en absence de calcium extracellulaire. 93

Figure 31 : Histogramme représentant l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'application d'ACh (10^{-4}M) après une préincubation avec les bloqueurs de protéines de la voie de signalisation couplée au récepteur mAChR-A : le 2-APB un inhibiteur des IP3R, le YM-254890 un inhibiteur de protéines Gαq/11 et le U-73122 un inhibiteur de la phospholipase C. 94

Figure 32 : Analyse de la variation du ratio 340nm/380nm dans les lignées stables exprimant le récepteur mAChR-A (*Sf*9-mAChR-A) ou le vecteur pIB (*Sf*9-pIB-vide) au cours du temps. Tracés représentant l'effet de l'acétylcholine et de l'oxotrémorine M ($5x10^{-7}$M) sur ces lignées stables. 95

Figure 33 : Effet du DEET sur la réponse calcique induite par l'application d'acétylcholine ou d'oxotrémorine M sur la lignée stable *Sf*9-mAChR-A. 96

Figure 34 : Variation du ratio 340nm/380nm dans la lignée stable *Sf*9-mAChR-A au cours du temps. Tracé représentant la variation du ratio 340 nm/380 nm en fonction du temps après l'application d'acétylthiocholine (AtCh ; 10^{-4}M). 97

Figure 35 : Courbe représentant l'activité résiduelle en % de l'acétylcholinestérase 1 d'*An. gambiae*, exprimée dans les lignées stables exprimant le récepteur mAChR-A ou le vecteur pIB/V5-His, en présence de concentrations croissantes de chlorpyrifos-éthyl. 98

Table des tableaux

Tableau 1 : Pharmacologie des récepteurs muscariniques humains présents dans les astrocytes de la lignée cellulaire 1321 N1 et exprimés en système hétérologue (lignées cellulaires CHO ou HEK293). 54

Tableau 2 : Pharmacologie des récepteurs muscariniques d'insectes exprimés en système hétérologue. 58

Tableau 3 : Tableau résumant la séquence des amorces utilisées pour le clonage moléculaire, le numéro d'accession des séquences utilisées pour leur conception et la température d'hybridation (Th). 69

Tableau 4 : Tableau résumant la séquence des amorces utilisées en PCR quantitative, le numéro d'accession des séquences utilisées pour leur conception et la température d'hybridation (Th). 71

Tableau 5 : Tableau récapitulatif indiquant le nombre de variants pour chaque type de récepteurs mAChRs d'anophèles, les N° d'accession des séquences protéique et nucléotidique prédites chez le moustique *An. gambiae* suite à un BLASTp réalisé avec les séquences protéiques de la drosophile *D. melanogaster*. 81

Tableau 6 : Tableau récapitulatif de l'effet maximal (Emax), du coefficient de Hill (nH) et de l'EC_{50} pour chaque agoniste testé sur le mAChR-A d'anophèle..... 90

Tableau 7 : Tableau récapitulatif de l'inhibition maximale, du coefficient de Hill (nH) et de l'IC_{50} du chlorpyrifos-éthyl pour chacune des lignées exprimant l'AChE1. 98

Annexe

Ce travail de thèse a fait l'objet d'une publication :

Pilon A., Goven D. & Raymond V. (2022). Pharmacological and molecular characterization of the A-type muscarinic acetylcholine receptor from *Anopheles gambiae*. Insect molecular biology. https://doi.org/10.1111/imb.12775

Received: 24 September 2021 | Accepted: 24 March 2022

DOI: 10.1111/imb.12775

ORIGINAL ARTICLE

Insect Molecular Biology

Royal Entomological Society

Pharmacological and molecular characterization of the A-type muscarinic acetylcholine receptor from *Anopheles gambiae*

Alexandre Pilon | **Delphine Goven** | **Valerie Raymond**

Univ Angers, INRAE, SiFCIR Laboratory, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

Correspondence
Valerie Raymond, Univ Angers, INRAE, SiFCIR Laboratory, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France.
Email: valerie.raymond@univ-angers.fr

Abstract

Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) which are G protein-coupled receptors play key roles in insect physiology. Whereas vertebrate mAChRs are important targets for pharmaceutical drugs, insect mAChRs are under-exploited by the agro-chemical industry. Moreover, insect mAChRs have been less well studied than their vertebrate counterparts. Their critical functions mean that a better knowledge of the insect mAChRs is crucial for the effort to develop a new molecular-level strategy for insect pest management. Almost all insects possess three mAChRs named A, B and C which differ according to their coupling effector systems and their pharmacological profile. The aim of this study was to characterize the A-type mAChR (mAChR-A) from *Anopheles gambiae* which is the major vector of malaria in order to develop new strategies in pest management. In this paper, we reported that mAChR-A is more expressed in adult mosquitoes than in larvae. Furthermore, using calcium imaging recordings, we found that the *An. gambiae* mAChR-A expressed in *Sf*9 cells is activated by specific muscarinic agonists acetylcholine, muscarine and oxotremorine M and blocked by several mAChR antagonists. Moreover, using inhibitors of phosphoinositide pathway such as $G\alpha_{q/11}$ protein blocker, we have shown that an increased intracellular calcium concentration elicited by the acetylcholine application was mediated by PLC/IP3R pathway. As a rise in intracellular calcium concentration could lead to an increase in the insecticide target sensitivity, these results suggest that *An. gambiae* mAChR-A should not be only considered as a potential target for new molecules but also as a key element to optimize the efficacy of insecticide in vector control.

KEYWORDS
Anopheles gambiae, calcium signalling, heterologous system, insects, muscarinic acetylcholine receptor

INTRODUCTION

Acetylcholine (ACh) was the first neurotransmitter to be identified. ACh can act on nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) which are ligand-gated ion channels or on muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) which are G protein-coupled receptors (GPCRs). In insects, ACh is the most abundant neurotransmitter in the brain (Breer, 1987). As a consequence, a large number of insecticides act on components of the cholinergic system such as nAChRs and the ACh-degrading enzyme acetylcholinesterase. Nevertheless, for several years, a growing interest has emerged to consider the GPCRs as potential targets for new insecticides (Audsley & Down, 2015; Hill et al., 2018; Liu et al., 2021). Indeed, the critical functions of GPCRs in cell physiology and behaviour allow considering these proteins as important targets for the development of new chemicals for insect pest management. In vertebrates, GPCR receptors are important targets for pharmaceutical drugs but such receptors are poorly exploited by the agro-chemical industry. Among the GPCR family, only the insect octopamine

 © 2022 Royal Entomological Society.

receptor is the target of insecticides (Ozoe, 2021). As the ACh is the major excitatory neurotransmitter in the insect nervous system, insect mAChRs could play an important role in the pest control. Muscarinic receptors belong to the large family of G protein-coupled receptors which were described as one of the most important classes of proteins in living organisms (Kenakin, 2013). These receptors transduce extracellular signals and interact with heteromeric G proteins that activate downstream effectors. Their main structural features are the seven transmembrane (TM) domains and a disulphide bond between two cysteines conserved in most GPCRs (Bockaert & Pin, 1999; Caulfield, 1993). In mammals, five mAChR subtypes (M1-M5) encoded by five distinct genes have been identified and classified into two groups on the basis of coupled effector systems. M1, M3 and M5 receptor subtypes are coupled to $G\alpha_{q/11}$ which activates the phosphoinositide pathway leading to an increase in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) whereas M2, M4 receptor subtypes are coupled to $G\alpha_{i/O}$ which inhibits adenylate cyclase activity resulting in a decrease of cAMP intracellular concentration ($[cAMP]_i$) (Elefsinioti et al., 2004; Kruse et al., 2014). The mAChR subtypes present diverse pharmacological profiles. Thus, they can be differentiated by the use of selective antagonists (Caulfield, 1993; Gentry et al., 2014; Lazareno & Birdsall, 1993).

Even if it has been found that insects possess different types of mAChRs (Collin et al., 2013; Lü et al., 2011; Xia et al., 2016), the insect mAChRs have been less explored than their mammal counterparts. The first insect mAChR was isolated from the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Onai et al., 1989; Shapiro et al., 1989). Since then, three types of mAChRs, named A-, B- and C-type, have been characterized in *D. melanogaster* (Collin et al., 2013; Ren et al., 2015; Xia et al., 2016). The A- and B-type orthologous were also characterized in the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Collin et al., 2013). Functional expression of these receptors in heterologous systems revealed that these different types of mAChRs have distinct pharmacological profiles. The mAChR-A and mAChR-C present mAChR classical pharmacology similar to the mammalian M1-M5 mAChRs. They are activated by acetylcholine and oxotremorine M and blocked by classical mAChR antagonists such as atropine or scopolamine (Cordova et al., 2003; Ren et al., 2015; Xia et al., 2016). By contrast, the mAChR-B presents an unusual pharmacology, which is not found in vertebrate mAChRs (Collin et al., 2013; Xia et al., 2016). Indeed, mAChR-B is 1000-fold less sensitive to muscarine than mAChR-A and is not blocked by the classical mAChR antagonists (atropine, scopolamine, 3-quinuclidinyl-benzilate [QNB]). These receptors are also coupled to different pathways. Drosophila mAChR-B is linked to $G\alpha_{i/O}$ and its activation induces a decrease of $[cAMP]_i$ whereas mAChR-A and mAChR-C are coupled to $G\alpha_{q/11}$ and their activation elicits an increase of $[Ca^{2+}]_i$ (Collin et al., 2013; Ren et al., 2015; Xia et al., 2016). Moreover, previous studies demonstrated that a rise of $[Ca^{2+}]_i$ elicited by the activation of mAChR increases the sensitivity of molecular targets to insecticide (Abd-Ella et al., 2015; Moreau et al., 2020). Thus, insect mAChRs could be considered as new insecticide targets but also as a key element to optimize the efficacy of insecticide treatments. Therefore, increasing our knowledge of insect mAChRs is needed to develop novel strategies against pest insects. In the present study, we characterized the mAChR-A from the mosquito *Anopheles gambiae* which is the major vector of malaria. We demonstrated that this receptor is differently expressed in larvae and adult mosquitoes. Using calcium imaging and pharmacological tools, we have shown that the *An. gambiae* mAChR-A is coupled to $G\alpha_{q/11}$ pathway.

RESULTS

Cloning and sequence analysis of the A-type mAChR from *An. gambiae*

Two A-type mAChR protein sequences of *Drosophila melanogaster* (Collin et al., 2013) available on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database were used. These sequences correspond to the two A-type mAChR isoforms found in drosophila which differ in their sequence length (accession numbers NP_726440.1 and NP_523844.2). These sequences were individually compared with the *Anopheles gambiae* protein database using BLASTp tool and were allowed to identify one orthologue which was designated as mAChR-A (accession number XP_314486.1). The predicted nucleotide sequence was repertory under the accession number XM_314486 in NCBI. The Open Reading Frame (ORF) of *An. gambiae* mAChR-A was obtained by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using the specific primers. The mAChR-A sequence contains 1989-pb nucleotides (accession number MZ558519) that differ from the predicted sequence (accession number XM_314486) by four nucleotides inducing four silent gene mutations and encodes a 662-amino acid protein with a predicted molecular weight of 74.08 kDa and an isoelectric point of 9.17. An alignment of *An. gambiae* mAChR-A protein sequence with the two *D. melanogaster* A-type mAChR protein sequences revealed that *An. gambiae* mAChR-A shares 63.47% sequence identity with the drosophila mAChR-A isoform A (accession number NP_726440.1) and 61.98% sequence identity with the drosophila mAChR-A isoform B (accession number NP_523844.2). Analysis of the *An. gambiae* mAChR-A sequence shows that this protein possesses features specific to G protein-coupled receptors (GPCRs). These include (1) seven transmembrane helices, (2) conserved amino acids involved in disulphide bond between the first and the second extracellular loop found in most GPCRs (Collin et al., 2013) and (3) residues known to form a consensus sequence involved in $G\alpha_{q/11}$ protein coupling (Burstein et al., 1995, 1996, 1998; Hill-Eubanks et al., 1996; Ren et al., 2015) suggesting that this receptor could be linked to intracellular Ca^{2+} signalling pathway (Figure 1a). The identification in the protein sequence of the residues involved in the acetylcholine binding site and the conserved amino acids among all mAChRs suggests that this GPCR is a muscarinic acetylcholine receptor (Figure 1a). Moreover, when the sequences of the two drosophila mAChR-A isoforms were compared,

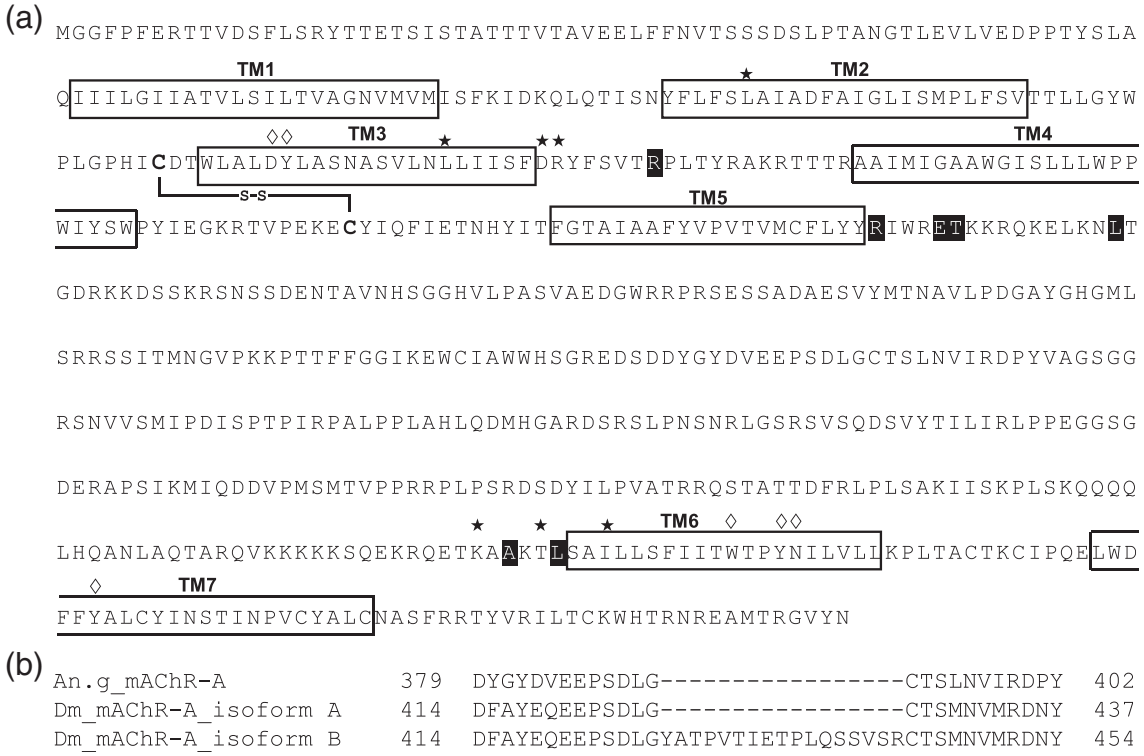

FIGURE 1 (a) *Anopheles gambiae* mAChR-A protein sequence characterization. The seven transmembrane segments (TM) predicted by TMHMM are framed and indicated by TM1 to TM7. The disulfide bond established between the 2 cysteine residues, in bold, which are located in the first and the second extracellular loop is represented by the two connected S (S-S). The six residues marked by diamonds are the predicted acetylcholine binding site (Haga et al., 2012; Xia et al., 2016). Conserved residues among all mAChRs are indicated by stars (Ren et al., 2015; Xia et al., 2016). Amino acids involved in $G\alpha_{q/11}$ protein coupling are highlighted in black (Ren et al., 2015). (b) Alignment of the specific part of the protein sequence of *D. melanogaster* mAChR-A which allows to differenciate the isoform A (Dm_mAChR-A_isoform A; NP_726440.1) from the isoform B (Dm-mAChR-B_isoform B; NP_523844.2) with that of the *An. gambiae* mAChR-A (An.g_mAChR-A; XP_314486.1)

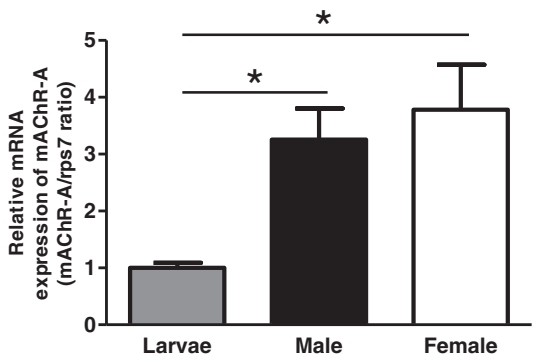

FIGURE 2 Normalized relative expression of A-type mAChR (mAChR-A) mRNA to the housekeeping gene *rps7* in neuronal cell suspensions of *An. gambiae* at different life stages (larvae, male or female). Each qPCR point was performed in duplicate and results are represented as the mean and standard error of values obtained from four biological replicates. *$p < 0.05$ was considered significantly different (Mann–Withney test)

a deletion of 17 amino acids was observed in the third intracellular loop of isoform A (Collin et al., 2013). The lack of these 17 amino acids is also found in the sequence of *An. gambiae* mAChR-A (Figure 1b).

Expression analysis of mAChR-A in different developmental stages of *An. gambiae*

To determine if mAChR-A is expressed in *An. gambiae* nervous system, the transcript level of mAChR-A in neuronal cell suspension coming from two development stages of mosquitoes (larvae and adult) was quantified by RT-qPCR. For the adult stage, experiments were performed separately on males and females. Our results show that the expression of mAChR-A in adults is significantly higher (approximately a three-fold increase) than that in larvae. However, there is no significant difference in mAChR-A expression between males and females (Figure 2).

Pharmacological characterization of *An. gambiae* mAChR-A

The *An. gambiae* mAChR-A was expressed in a heterologous system, the *Sf9* cells to explore its pharmacological profile and its intracellular coupling pathway. As the mosquito mAChR-A shares high sequence homology with the drosophila mAChR-A and it possesses a consensus sequence involved in $G\alpha_{q/11}$ protein coupling, intracellular Ca^{2+}

changes were measured using calcium ratio imaging. First of all, various biogenic amines (serotonin, tyramine, dopamine, ACh) and glutamate were tested on the *Sf*9 cells expressing *An. gambiae* mAChR-A in order to determine if this GPCR is a cholinergic receptor. Only the application of ACh induced an increase in the intracellular Ca^{2+} level, the application of the serotonin (10^{-4} M) elicited no change in the Ca^{2+} level (Figure 3; $n = 26–37$ cells from three different transfections) as well as the glutamate and the other tested biogenic amines (Data not shown). The same results were obtained with an application of these molecules at 10^{-7} M (Data not shown). These results confirm that *An. gambiae* mAChR-A is a cholinergic receptor. However, the application of nicotine at 10^{-7} M or 10^{-4} M did not induce calcium responses suggesting that this cholinergic receptor belongs to the mAChR group (Data not shown). Application of the mAChR agonists namely ACh, muscarine and oxotremorine M on mAChR-A led to the increase of the intracellular Ca^{2+} level in a concentration-dependent manner. Concentration-response curves were established for these three agonists with concentrations ranging from 10^{-9} M to 10^{-4} M (Figure 4). The concentration-response relationship between the agonist and the rise of intracellular Ca^{2+} level led to determining the maximal effect (Emax) for each agonist, its EC_{50} corresponding to the half-maximal effective concentration and its hill slope (nH) (Table 1). According to the EC_{50}, the following ranking order can be established: muscarine ($EC_{50} = 5.19 \times 10^{-7}$ M) > oxotremorine M ($EC_{50} = 4.98 \times 10^{-7}$ M) > ACh ($EC_{50} = 3.65 \times 10^{-7}$ M). No significant difference was observed in the sensitivity of mAChR-A for these three agonists. However, the efficacy of muscarine in eliciting maximum Ca^{2+} response was found to be lower than that of ACh. At the concentration for which ACh, oxotremorine M and muscarine induced maximum calcium response, oxotremorine M elicited 91.50 ± 4.99% and muscarine 72.15 ± 2.92% of the maximum-ACh induced response. Thus, ACh and oxotremorine M showed a higher efficacy on the mAChR-A than muscarine. Since ACh induced the largest intracellular Ca^{2+} level changes, ACh was further used to evaluate the effects of mAChR antagonists. The ACh-elicited increase in Ca^{2+} level was blocked by the well-known non-selective mAChR antagonist, atropine (Figure 5a). Calcium response induced by the application of ACh (3×10^{-7} M) was blocked in a concentration-dependent manner by atropine. To precise the pharmacological profile of *An. gambiae* mAChR-A, we tested four mAChR antagonists, pirenzepine, AF-DX 116, 4-DAMP and tropicamide known to block respectively the M1, M2, M3 and M4 subtypes of vertebrate mAChRs (Figure 5b-e). All these compounds blocked mAChR-A Ca^{2+} response to ACh (3×10^{-7} M). However, if we compared the effects of these four antagonists, the application of 4-DAMP at 10^{-6} M almost completely blocked the response induced by ACh (95.72 ± 2.09%) whereas, at the same concentration, pirenzepine, AF-DX 116 and tropicamide decreased the Ca^{2+} response elicited by ACh by 31.93 ± 6.53%, 49.09 ± 10.93% and 76.60 ± 8.90% respectively. These

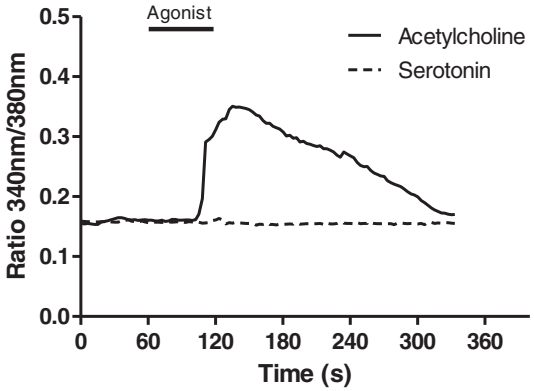

FIGURE 3 Typical traces showing the variation of the ratio 340 nm/380 nm induced by acetylcholine or serotonin application (10^{-4} M) on *Sf*9 cells expressing *An. gambiae* mAChR-A. The fluorescence ratio of the emission at 510 nm from individual Fura 2-loaded cells upon excitation at 340 nm and 380 nm (ratio 340 nm/380 nm) was recorded in real time as a relative indicator of intracellular calcium concentration

TABLE 1 Agonist effects of acetylcholine, muscarine and oxotremorine M on *An. gambiae* mAChR-A

	Acetylcholine	Muscarine	Oxotremorine M
EC_{50} ($\times 10^{-7}$ M)	3.65 ± 1.27	5.19 ± 1.11	4.98 ± 1.24
Emax	0.38 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.35 ± 0.02
nH	0.99 ± 0.21	1.69 ± 0.30	1.12 ± 0.25

Note: Data are represented as means ± SEM ($n = 13–70$ cells from 3 to 5 transfections).

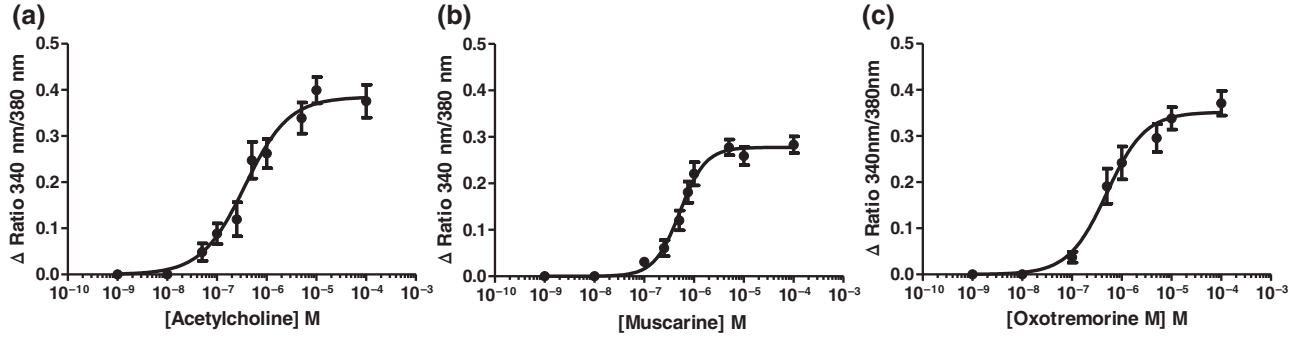

FIGURE 4 Dose-reponse curves of acetylcholine (a), muscarine (b) and oxotremorine M (c) obtained from ratio 340 nm/380 nm recording experiments on *Sf*9 cells expressing *An. gambiae* mAChR-A. Data are means ± SEM. ($n = 13$ to 70 cells from 3 to 5 transfections)

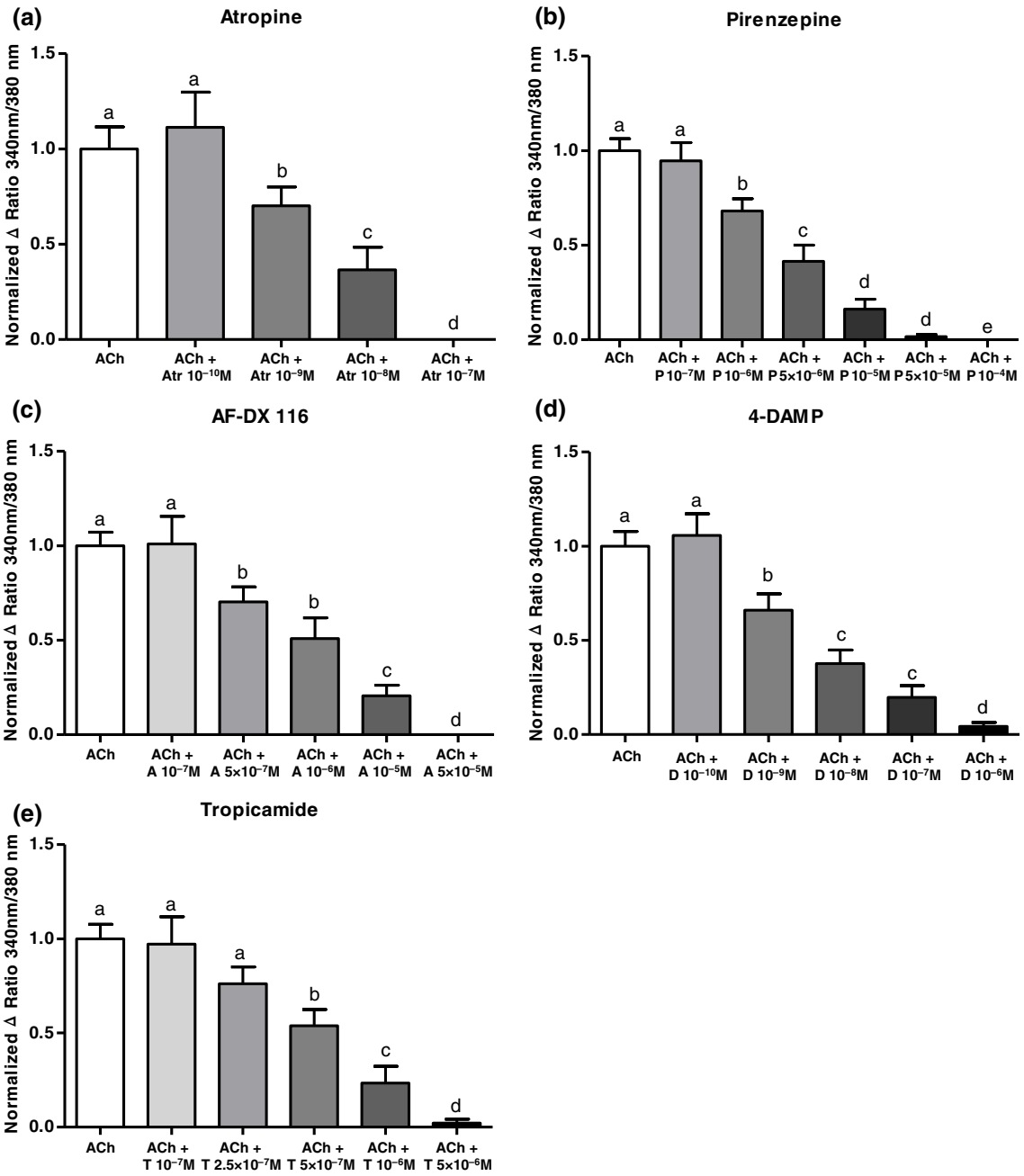

FIGURE 5 Effects of mAChR antagonists on ACh-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in *Sf*9 cells expressing *An. gambiae* mAChR-A. The Δ ratio 340 nm/380 nm is determined after the application of ACh (3×10^{-7} M) with (a) atropine, (b) pirenzepine, (c) AF-DX 116, (d) 4-DAMP or (e) tropicamide and normalized to the Δ ratio 340 nm/380 nm obtained after the application of ACh alone (3×10^{-7} M). Different letters above the bars indicate significant differences among different antagonist concentrations and bars with the same letter are not significantly different at the 5% significance level as determined by Mann–Withney test ($n = 41$ to 202 cells from 3 to 5 differents transfections). ACh, acetylcholine; Atr, atropine; P, pirenzepine; A, AF-DX 116; D, 4-DAMP; T, tropicamide

results suggest that *An. gambiae* mAChR-A is more sensitive to 4-DAMP than to other mAChR antagonists.

Characterization of the mAChR-A signalling pathway

In order to determine the origin of the Ca^{2+} contributing to the rise of intracellular Ca^{2+} level induced by mAChR agonists, the dependence upon extracellular Ca^{2+} was explored using Ca^{2+}-free medium. In this experimental condition, the ACh-induced Ca^{2+} response was reduced by $66.50 \pm 8.98\%$ but wasn't completely blocked (Figure 6a) suggesting that part of the ACh-elicited Ca^{2+} response could provide by internal Ca^{2+} stores. To further investigate this hypothesis, *Sf*9 cells expressing mAChR-A were pre-incubated in saline containing 2-APB (10^{-5} M) which is known as an IP3 receptor inhibitor. In the presence of 2-APB, the Ca^{2+} response induced by ACh (10^{-4} M) was

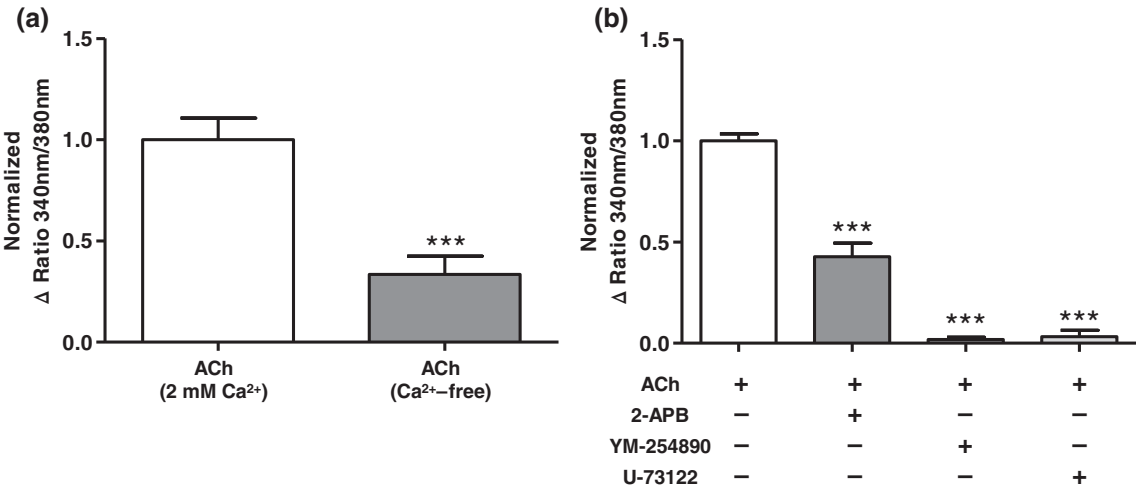

FIGURE 6 Origin of Ca^{2+} involved in the ACh-induced Ca^{2+} increase. (a) Histogram representing the intracellular calcium level change obtained after the application of ACh (10^{-4} M) in the presence (2 mM Ca^{2+}) or absence of external calcium (Ca^{2+} − free). Data are means ± SEM ($n = 23$ cells from 3 experiments), ***$p < 0.001$ (Mann–Withney test). (b) Histogram showing $[Ca^{2+}]_i$ level (normalized Δ ratio 340 nm/380 nm) changes induced by ACh application (10^{-4} M) after a pre-incubation with $G\alpha_{q/11}$ pathway blockers: The IP3R inhibitor 2-APB (10^{-5} M), the $G\alpha_{q/11}$ inhibitor YM-254890 (10^{-6} M) or the PLC inhibitor U-73122 (10^{-5} M). Data are represented as means ± SEM ($n = 25$–134 cells from 3 to 6 experiments), ***$p < 0.001$ (Mann–Withney test)

inhibited by 57.28 ± 6.70% (Figure 6b). According to this result and the fact that *An. gambiae* mAChR-A sequence possesses residues known to form a consensus sequence involved in $G\alpha_{q/11}$ protein coupling, experiments were performed to determine if the intracellular Ca^{2+} signalling pathway of mAChR-A involves phospholipase C (PLC) activation to synthesize IP3. For that, an inhibitor of $G\alpha_{q/11}$, YM-254890 and an inhibitor of PLC, U-73122, were tested on *Sf*9 cells expressing mAChR-A. The ACh-induced Ca^{2+} responses were strongly blocked by these two inhibitors (Figure 6b). Indeed, pre-incubation of the cells with YM-254890 or U-73122 decreased the ACh-elicited Ca^{2+} response to 1.90 ± 1.11% and 3.22 ± 3.22% respectively. These results show that the mAChR-A response induced by mAChR agonists is mediated by $G\alpha_{q/11}$ protein and IP3/Ca^{2+} pathway.

DISCUSSION

In this study, we reported for the first time the characterization of the *Anopheles gambiae* muscarinic acetylcholine receptor named mAChR-A. Using bioinformatic tools, we have shown that the amino acid sequence of this receptor shares around 62%, 33% and 23% sequence identity with *D. melanogaster* mAChR-A, mAChR-B and mAChR-C respectively. The *An. gambiae* mAChR-A contains seven transmembrane domains, conserved residues among all mAChRs and conserved amino acids critical for $G\alpha_{q/11}$ protein coupling. Two mAChR-A isoforms were found in drosophila (Collin et al., 2013). The alignment of *An. gambiae* mAChR-A with these two drosophila mAChR-A isoforms indicates that *An. gambiae* mAChR-A is more related to the drosophila mAChR-A isoform A which presents a shortest intracellular loop between TM5 and TM6 than drosophila mAChR-A isoform B. In vertebrates, this loop is known to contribute to the desensitization and the internalization of mAChRs (Lee et al., 2000). Immunohistochemistry studies have shown that the drosophila mAChR-A was localized in the mushroom bodies, the antennal lobes and the optic lobes (Blake et al., 1993; Harrison et al., 1995). Using qPCR experiments, we demonstrated that the mAChR-A is expressed in *An. gambiae* nervous system. Furthermore, we found that the mAChR-A is more expressed in adults than in larvae mosquito heads. In *D. melanogaster*, the mAChR-A is also less expressed in larvae than in male adult heads. In contrast to *An. gambiae*, a significant difference is observed between the expression level of mAChR-A mRNA in drosophila male and female adults. Indeed, drosophila female adult head contained a lower concentration of mRNA for the mAChR-A compared to males (Collin et al., 2013). These results suggest that the insect mAChR-A could play different roles in larvae and adult and according to the insect species, its function could be different in female and male adults. The *An. gambiae* mAChR-A was expressed in *Sf*9 cells to investigate its pharmacology and its signalling pathway. The sequence analysis of this receptor suggests that *An. gambiae* mAChR-A could be coupled to IP3/Ca^{2+} second messenger pathway *via* $G\alpha_{q/11}$. Application of ACh induced a calcium response whereas application of serotonin, dopamine, tyramine or glutamate had no effect. The pharmacological properties of the *An. gambiae* mAChR-A are close to those of the *D. melanogaster* and *T. castaneum* mAChR-A (Blake et al., 1993; Collin et al., 2013). ACh, muscarine and oxotremorine M activated the *An. gambiae* mAChR-A and atropine blocked the response elicited by the application of ACh. In order to precise the pharmacological profile of this receptor, different antagonists were used. Thus, we demonstrated that the 4-DAMP, well-known as M3 mAChR antagonist in mammals (Caulfield, 1993), is the most efficient antagonist on the *An. gambiae* mAChR-A.

As the application of mAChR-A agonist-induced intracellular calcium level changes and the mAChR-A sequence contains specific amino

acid residues involved in $G\alpha_{q/11}$ protein coupling, we hypothesized that activation of *An. gambiae* mAChR-A elicited phosphoinositide pathway leading to intracellular calcium level changes. Moreover, our finding that the removal of external calcium does not completely abolish the ACh-induced calcium increase suggests that internal calcium stores could be involved in the calcium response. To explore this hypothesis, experiments using blockers targeting this intracellular pathway were performed. We demonstrated that *An. gambiae* mAChR-A is coupled to $G\alpha_{q/11}$ and induces calcium rise via the PLC/IP3R pathway (Figure 7).

Calcium is a ubiquitous ion that plays a key role in various cell processes. In insect neurons, changes in calcium concentration modify the sensitivity of target sites to insecticides (Deshayes et al., 2018). Previous studies demonstrated that biological as well as chemical agents are able to increase the target sensitivity to insecticide through intracellular calcium concentration changes. Indeed, biological agents such as insect viruses elicited intracellular calcium rise which potentiates the insecticide efficiency while reducing the concentration used (Apaire-Marchais et al., 2016; Licznar et al., 2014). Several studies have shown that chemical agents can also be used to increase target sensitivity to insecticide (Abd-Ella et al., 2015; Moreau et al., 2020; Pitti Caballero et al., 2019). Chemical compounds used as synergistic agents induce calcium increase leading to sensitization of insecticide targets through the activation of intracellular pathways including enzymes such as PKA, PKC or CaM-kinase II (Bodereau-Dubois et al., 2012; Calas-List et al., 2013; Lavialle-Defaix et al., 2010; List et al., 2014; Raymond et al., 2017).

Thus, insect mAChRs which are coupled to calcium-dependent pathways can play a key role in the potentiation of insecticide efficiency. Previous studies demonstrated that the $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by the activation of insect mAChRs by insect repellent such as DEET or IR3535 used at sub-repulsive concentrations is sufficient to rise the sensitivity of the membrane target to insecticide (Abd-Ella et al., 2015; Moreau et al., 2020). Taken together, these results suggest that this *An. gambiae* mAChR-A should be considered as a key factor to optimize the efficacy of insecticide in vector control. Thus, increasing our knowledge of insect mAChRs is important to develop new strategies in pest control.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Identification of mAChRs from *An. gambiae* and sequence analysis

Putative protein sequences of *An. gambiae* mAChRs were identified by protein sequence homology using the BLASTp program (Altschul

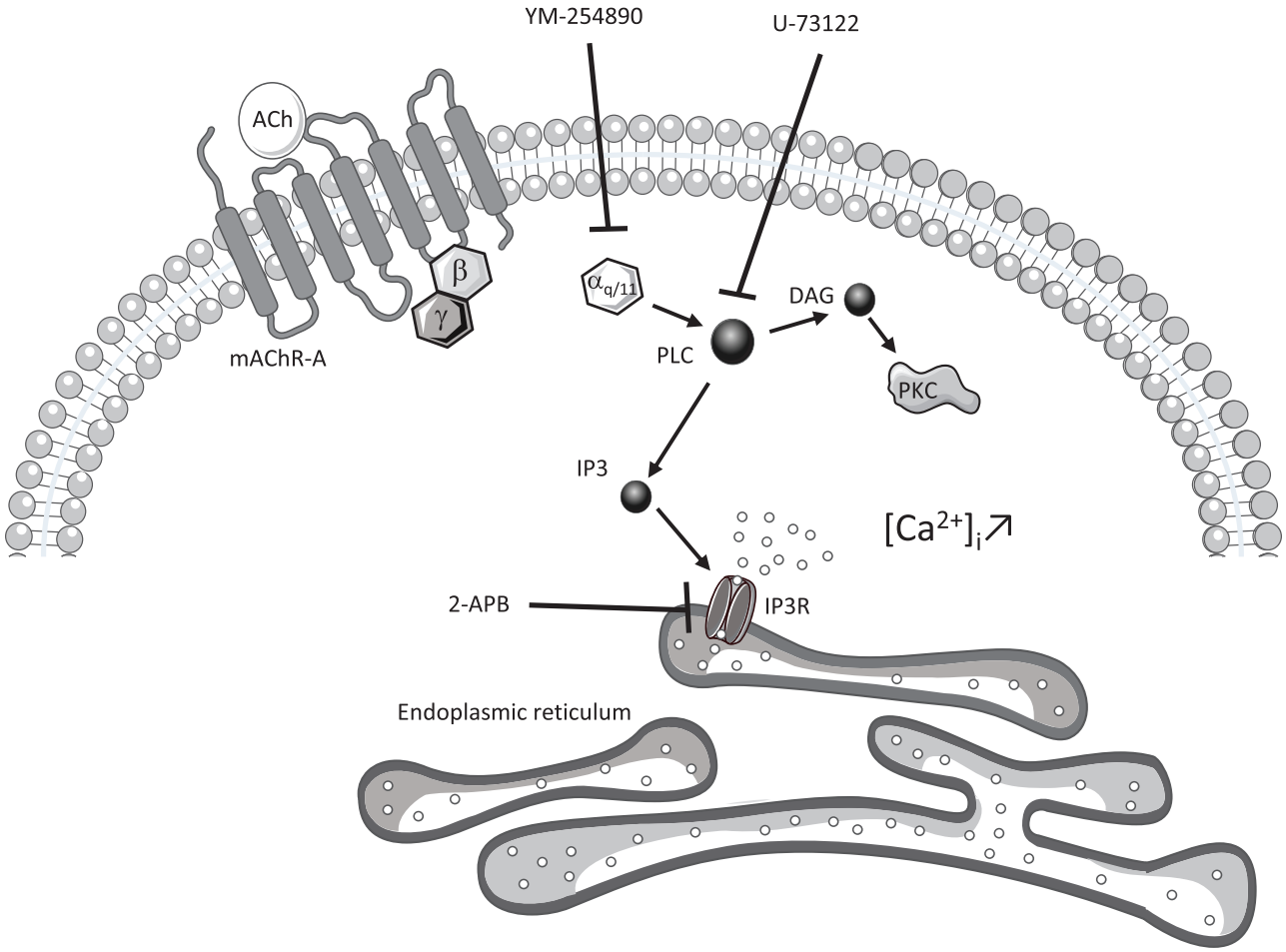

FIGURE 7 Intracellular pathway involved in $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by *Anopheles gambiae* mAChR-A activation

et al., 1990) against the *An. gambiae* non-redundant protein sequence database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using two A-type mAChR isoform protein sequences of *D. melanogaster* (accession numbers NP_726440.1 and NP_523844.2). The Open Reading Frame (ORF) of the predicted protein was determined using the nucleotide sequence available in the NCBI database which is linked to the identified protein sequence. To determine the conserved G protein interaction motifs, *An. gambiae* and *D. melanogaster* protein sequence alignment was performed in Clustal Omega. Transmembrane domains of deduced proteins were predicted using the TMHMM Server. The molecular weight and isoelectric point of A-type mAChR protein were predicted using compute pI/Mw tool on the ExPASy website (https://web.expasy.org/compute_pi/).

Mosquito strain and rearing

Anopheles gambiae mosquito Kisumu strain which is the insecticide-susceptible reference strain was used in this study. Eggs were provided by the MIVEGEC laboratory (UMR IRD-CNRS-Montpellier University, France). Mosquitoes were maintained in the laboratory under stable conditions: 26°C and 80% relative humidity with 12:12 h light:dark photoperiod. Adult mosquitoes were reared with 10% honey solution ad libitum, while larvae were fed daily with fish food (Tetramin®).

Mosquito neuronal cell isolation

To isolate neuronal cells, heads of larvae and adult mosquitoes whose antennae, maxillary palps, labium and antennal pedicels were previously removed under a binocular microscope were excised. For each sample, 100 mosquito heads were put in 1 ml mosquito saline buffer (130 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 3 mM $MgCl_2$; 5 mM $CaCl_2$; 5 mM HEPES; pH was adjusted to 7.1 with NaOH) and mechanically dissociated by repetitive suctions through fire-polished glass Pasteur pipettes of decreasing diameter as previously described (Lavialle-Defaix et al., 2010). The cell suspension was then transferred to a new microtube to remove head debris. The supernatant was removed from the microtube after centrifugation (10 min, 5000 g, 4°C) and a neuronal cell pellet was kept to perform RNA extraction.

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA from neuronal cell pellets was extracted with NucleoSpin® RNA kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions and eluted in 60 μl of RNase-free water. After overnight sodium acetate/ethanol precipitation, 4 μg of purified RNA were reverse transcribed using RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and cDNA samples were stored at −20°C until use.

Real-time quantitative PCR experiments

In order to study mRNA expression of A-type mAChR at different stages of *An. gambiae* development, real-time quantitative PCR (qPCR) experiments were carried out on larvae and adult (male and female) cDNA. Relative mAChR mRNA expressions were determined with MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay Low ROX (Eurogentec, Seraing, Belgium) using Chromo 4™ thermocycler (Biorad, Hercules, CA) and analysed with Opticon monitor 3.1 software (Biorad, Hercules, CA). Each reaction was performed in duplicate and normalized to the expression level of the housekeeping gene *rps7* which codes for ribosomal protein S7. Each reaction of qPCR was performed in 20 μl with 10 μl of the SYBR Green mastermix (2X), 2 μl of each qPCR primer (10 μM) (A-type mAChR: Forward 5′-TCCGTGATCCATATGTGGCC-3′, Reverse 5′-TGAGGATGGTGTACACGGAG-3′; rps7: Forward 5′-GCCATCCTGGAGCTGGAGATGAA-3′, Reverse 5′-GACGGGTCTGTACCTTCTGGA-3′), 5 μl of 1:100 diluted cDNA sample and 1 μl of ultrapure H_2O. The optimized qPCR program consisted of an initial denaturation step at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of denaturation step of 15 s at 95°C, then a hybridization step of 1 min at the annealing temperature (65°C) and an elongation step of 1 min at 72°C. The specificity of each pair of primers was confirmed by melting curve analysis. The efficiency of each qPCR amplification for gene-specific primers remained between 98% and 102%. Relative mRNA expression levels were evaluated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001).

Molecular cloning of A-type mAChR

The A-type mAChR full-length ORF sequence was amplified by PCR from neuronal cell cDNA using gene-specific primers (Forward: 5′-GGAATTCCATGGGTGGGTTTCCGTT-3′; Reverse: 5′-GCTCTAGAGCTCAGTTATAGACACCCCG-3′), which contain the restriction sites EcoRI and XbaI, respectively. PCR amplification was performed in 20 μl reaction volume with 0.4 μl Novagen™ KOD Hot Start DNA polymerase (1 U/μl; Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France), 2 μl of cDNA (100 ng/μl), 2 μl 10X KOD buffer, 0.4 μl dNTP (10 mM), 1.2 μl $MgSO_4$ (10 mM), 0.6 μl of each primer (10 μM) and 12.8 μl of ultrapure H_2O. The PCR conditions are as follows; initial denaturation at 95°C for 2 min, tracked by 35 cycles of amplification (95°C for 20 s, 65°C for 10 s and 70°C for 1 min) and a final extension at 70°C for 7 min. PCR products of the expected size were purified from 0.8% agarose gel using NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). The full-length cDNA of A-type mAChR was cloned into pCR-Blunt vector according to the instructions of Zero Blunt PCR Cloning kit (Invitrogen, Waltham, MA). The pCR-Blunt vector carrying the A-type mAChR sequence was digested with the EcoRI and XbaI enzymes (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) and the produced fragment was gel-purified before its subcloning into the EcoRI/XbaI digested pIB-V5/His expression vector. Plasmids were purified using NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel, Düren, Germany) and subjected to sequencing (Eurofins, Köln, Germany). The positive plasmid was named pIB-mAChR-A.

Heterologous expression of A-type mAChR in lepidopteran *Sf9* cells

Spodoptera frugiperda 9 (*Sf9*) cells (ATCC CRL-1711) were maintained in SF-900TM II SFM (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) at 28°C. Seventy-two hours before transfection, the cells were plated on a glass coverslip coated with poly D lysine (0.1 mg/ml) in 35 mm Petri dishes. The *Sf9* cells were then transfected by pIB-mAChR-A (1 μg) using Escort IV transfection reagent (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO). The culture medium was changed at 7 h post-transfection and transfected cells were incubated for 96 h at 28°C.

Fluorescence recordings of intracellular calcium

After incubation, transfected *Sf9* cells maintained on the glass coverslip were rinsed with *Sf9* physiological saline (PS) (NaCl 131 mM; KCl 4 mM; $CaCl_2$ 2 mM; $MgCl_2$ 2 mM; HEPES 10 mM; pH was adjusted to 7 with NaOH) added with sucrose (10 mM) and then incubated in PS added with sucrose (10 mM), Pluronic acid F68 (0.05%) and Fura 2-AM (2 mM) during 40 min in the dark at 37°C. The coverslip was then rinsed once with PS added with sucrose (10 mM), and twice with PS. The coverslip formed the base of the 500 μl perfusion chamber (Warner instrument, Holliston, MA) which was mounted on an inverted fluorescence microscope Nikon Eclipse Ti (Nikon, Amsterdam, Netherland) equipped with a ×40 objective. Using a filter wheel, cells were illuminated at 340 nm and 380 nm with a transilluminator Lambda DG-4 (Sutter Instrument, Novato, CA) and a light filter obtained from Semrock (Rochester, NY). The emitted light was collected through a dichroic mirror set to 510 nm and acquired with the camera orca-R2-C10600 (Hammamatsu, Massy, France). Signals were analysed with the software Imaging Workbench 6.0 (Indec Biosystem, Los Altos, CA). Tested solutions were perfused in the chamber by gravity flow with a VC-6 perfusion system (Warner Instrument, Holliston, MA). The mAChR agonists were applied for 60 s. To evaluate the effect of the mAChR antagonists (atropine, pirenzepine, AF-DX 116, 4-DAMP and tropicamide), a pre-treatment of 180 s with the antagonist was done prior to the co-application of the antagonist with ACh at 3×10^{-7} M. At the end of each experiment, the cells were challenged with ACh at 10^{-4} M during 60 s. To determine the participation of extracellular calcium in the recorded calcium responses, Ca^{2+}-free saline (where $CaCl_2$ was replaced by $MgCl_2$ and added EGTA (2 mM)) was applied for180 sec followed by an application of ACh (10^{-4} M; 60 s) in Ca^{2+}-free saline. Protein inhibitors (2-APB, U-73122 and YM-254890) used to characterize the phosphoinositide pathway were added to the Fura 2-AM incubation saline. Salts, HEPES, acetylcholine, muscarine, scopolamine, atropine, pirenzepine, AF-DX 116, 4-DAMP, EGTA and U-73122 were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO). Oxotremorine M, tropicamide and 2-APB were obtained from Tocris Bioscience (Bristol, UK). YM-254890 was obtained from Coger (Paris, France).

Statistical analysis

For calcium imaging and qPCR experiments, results were expressed as mean ± SEM and statistical analysis was performed with the Mann–Whitney test ($p < 0.05$) using Graphpad Prism version 5.00 (Graphpad Software, San Diego, CA). Statistical analysis is considered as significant for $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are openly available in NCBI at https://www.ncbi.nlm.nih.gov/, reference number MZ558519.

ORCID

Alexandre Pilon https://orcid.org/0000-0002-1106-3977
Delphine Goven https://orcid.org/0000-0002-7278-0486
Valerie Raymond https://orcid.org/0000-0002-8547-0671

REFERENCES

Abd-Ella, A., Stankiewicz, M., Mikulska, K., Nowak, W., Pennetier, C., Goulu, M. et al. (2015) The repellent DEET potentiates carbamate effects via insect muscarinic receptor interactions: an alternative strategy to control insect vector-borne diseases. *PLoS One*, 10(5), e0126406. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126406

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Apaire-Marchais, V., Ogliastro, M., Chandre, F., Pennetier, C., Raymond, V. & Lapied, B. (2016) Virus and calcium: an unexpected tandem to optimize insecticide efficacy. *Environmental Microbiology Reports*, 8(2), 168–178. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12377

Audsley, N. & Down, R.E. (2015) G protein coupled receptors as targets for next generation pesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 67, 27–37. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2015.07.014

Blake, A.D., Anthony, N.M., Chen, H.H., Harrison, J.B., Nathanson, N.M. & Sattelle, D.B. (1993) Drosophila nervous system muscarinic acetylcholine receptor: transient functional expression and localization by immunocytochemistry. *Molecular Pharmacology*, 44(4), 716–724.

Bockaert, J. & Pin, J.P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO Journal*, 18(7), 1723–1729. https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1723

Bodereau-Dubois, B., List, O., Calas-List, D., Marques, O., Communal, p.Y., Thany, S.H. et al. (2012) Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(2), 326–339. https://doi.org/10.1124/jpet.111.188060

Breer, H. (1987) *Neurochemical aspects of cholinergic synapses in the insect brain*. New York: Wiley.

Burstein, E.S., Spalding, T.A. & Brann, M.R. (1996) Constitutive activation of chimeric m2/m5 muscarinic receptors and delineation of G-protein coupling selectivity domains. *Biochemical Pharmacology*, 51(4), 539–544. https://doi.org/10.1016/0006-2952(95)02234-1

Burstein, E.S., Spalding, T.A. & Brann, M.R. (1998) The second intracellular loop of the m5 muscarinic receptor is the switch which enables G-

protein coupling. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(38), 24322–24327. https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24322

Burstein, E.S., Spalding, T.A., Braüner-Osborne, H. & Brann, M.R. (1995) Constitutive activation of muscarinic receptors by the G-protein Gq. *FEBS Letters*, 363(3), 261–263. https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00323-2

Calas-List, D., List, O., Quinchard, S. & Thany, S.H. (2013) Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of α-bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Neurotoxicology*, 37, 127–133. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.04.011

Caulfield, M.P. (1993) Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacology & Therapeutics*, 58(3), 319–379. https://doi.org/10.1016/0163-7258(93)90027-b

Collin, C., Hauser, F., Gonzalez de Valdivia, E., Li, S., Reisenberger, J., Carlsen, E.M. et al. (2013) Two types of muscarinic acetylcholine receptors in drosophila and other arthropods. Cellular and molecular life sciences. *CMLS*, 70(17), 3231–3242. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1334-0

Cordova, D., Delpech, V.R., Sattelle, D.B. & Rauh, J.J. (2003) Spatiotemporal calcium signaling in a Drosophila melanogaster cell line stably expressing a drosophila muscarinic acetylcholine receptor. *Invertebrate Neuroscience*, 5(1), 19–28. https://doi.org/10.1007/s10158-003-0024-2

Deshayes, C., Moreau, E., Pitti-Caballero, J., Froger, J.A., Apaire-Marchais, V. & Lapied, B. (2018) Synergistic agent and intracellular calcium, a successful partnership in the optimization of insecticide efficacy. *Current Opinion in Insect Science*, 30, 52–58. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.09.007

Elefsinioti, A.L., Bagos, p.G., Spyropoulos, I.C. & Hamodrakas, S.J. (2004) A database for G proteins and their interaction with GPCRs. *BMC Bioinformatics*, 5, 208. https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-208

Gentry, p.R., Kokubo, M., Bridges, T.M., Cho, H.P., Smith, E., Chase, P. et al. (2014) Discovery, synthesis and characterization of a highly muscarinic acetylcholine receptor (mAChR)-selective M5-orthosteric antagonist, VU0488130 (ML381): a novel molecular probe. *ChemMedChem*, 9(8), 1677–1682. https://doi.org/10.1002/cmdc.201402051

Haga, K., Kruse, A.C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C. et al. (2012) Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature*, 482(7386), 547–551. https://doi.org/10.1038/nature10753

Harrison, J.B., Chen, H.H., Blake, A.D., Huskisson, N.S., Barker, P. & Sattelle, D.B. (1995) Localization in the nervous system of Drosophila melanogaster of a C-terminus anti-peptide antibody to a cloned drosophila muscarinic acetylcholine receptor. *Journal of Neuroendocrinology*, 7(5), 347–352. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1995.tb00768.x

Hill, C.A., Sharan, S. & Watts, V.J. (2018) Genomics, GPCRs and new targets for the control of insect pests and vectors. *Current Opinion in Insect Science*, 30, 99–106. https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.08.010

Hill-Eubanks, D., Burstein, E.S., Spalding, T.A., Bräuner-Osborne, H. & Brann, M.R. (1996) Structure of a G-protein-coupling domain of a muscarinic receptor predicted by random saturation mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(6), 3058–3065. https://doi.org/10.1074/jbc.271.6.3058

Kenakin, T. (2013) Making receptors a reality: the 2012 Nobel prize in chemistry. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(1), 2–5. https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.11.003

Kruse, A.C., Kobilka, B.K., Gautam, D., Sexton, p.M., Christopoulos, A. & Wess, J. (2014) Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(7), 549–560. https://doi.org/10.1038/nrd4295

Lavialle-Defaix, C., Moignot, B., Legros, C. & Lapied, B. (2010) How does calcium-dependent intracellular regulation of voltage-dependent sodium current increase the sensitivity to the oxadiazine insecticide indoxacarb metabolite decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in insect pacemaker neurons? *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(1), 264–272. https://doi.org/10.1124/jpet.109.163519

Lazareno, S. & Birdsall, N.J. (1993) Pharmacological characterization of acetylcholine-stimulated [35S]-GTP gamma S binding mediated by human muscarinic m1-m4 receptors: antagonist studies. *British Journal of Pharmacology*, 109(4), 1120–1127. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13738.x

Lee, K.B., Ptasienski, J.A., Bunemann, M. & Hosey, M.M. (2000) Acidic amino acids flanking phosphorylation sites in the M2 muscarinic receptor regulate receptor phosphorylation, internalization, and interaction with arrestins. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(46), 35767–35777. https://doi.org/10.1074/jbc.M002225200

Licznar, P., List, O., Goven, D., Nna, R.N., Lapied, B. & Apaire-Marchais, V. (2014) A novel method using Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus for increasing the sensitivity of insecticide through calcium influx in insect cell line. *Journal of Virological Methods*, 195, 72–75. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.09.010

List, O., Calas-List, D., Taillebois, E., Juchaux, M., Heuland, E. & Thany, S.H. (2014) Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents. *Journal of Neurochemistry*, 130(4), 507–513. https://doi.org/10.1111/jnc.12752

Liu, N., Wang, Y., Li, T. & Feng, X. (2021) G-protein coupled receptors (GPCRs): signaling pathways, characterization, and functions in insect physiology and toxicology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5260. https://doi.org/10.3390/ijms22105260

Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C [T]) method. *Methods*, 25(4), 402–408. https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262

Lü, S.M., Zhao, Z., Li, K., Zhang, Y.L. & Xi, G.S. (2011) Cloning and expression analysis of a muscarinic cholinergic receptor from the brain of ant, Polyrhachis vicina. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 78(1), 46–60. https://doi.org/10.1002/arch.20438

Moreau, E., Mikulska-Ruminska, K., Goulu, M., Perrier, S., Deshayes, C., Stankiewicz, M. et al. (2020) Orthosteric muscarinic receptor activation by the insect repellent IR3535 opens new prospects in insecticide-based vector control. *Scientific Reports*, 10(1), 6842. https://doi.org/10.1038/s41598-020-63957-x

Onai, T., FitzGerald, M.G., Arakawa, S., Gocayne, J.D., Urquhart, D.A., Hall, L.M. et al. (1989) Cloning, sequence analysis and chromosome localization of a drosophila muscarinic acetylcholine receptor. *FEBS Letters*, 255(2), 219–225. https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81095-6

Ozoe, Y. (2021) Ion channels and G protein-coupled receptors as targets for invertebrate pest control: from past challenges to practical insecticides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 85(7), 1563–1571. https://doi.org/10.1093/bbb/zbab089

Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45. https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45

Pitti Caballero, J., Murillo, L., List, O., Bastiat, G., Flochlay-Sigognault, A., Guerino, F. et al. (2019) Nanoencapsulated deltamethrin as synergistic agent potentiates insecticide effect of indoxacarb through an unusual neuronal calcium-dependent mechanism. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 157, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.014

Raymond, V., Goven, D., Benzidane, Y., List, O. & Lapied, B. (2017) Influence of cellular and molecular factors on membrane target sensitivity

to insecticides. *Current Medicinal Chemistry*, 24(27), 2974–2987. https://doi.org/10.2174/0929867324666170316111315

Ren, G.R., Folke, J., Hauser, F., Li, S. & Grimmelikhuijzen, C.J. (2015) The A- and B-type muscarinic acetylcholine receptors from Drosophila melanogaster couple to different second messenger pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(4), 358–364. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.141

Shapiro, R.A., Wakimoto, B.T., Subers, E.M. & Nathanson, N.M. (1989) Characterization and functional expression in mammalian cells of genomic and cDNA clones encoding a drosophila muscarinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(22), 9039–9043. https://doi.org/10.1073/pnas.86.22.9039

Xia, R.Y., Li, M.Q., Wu, Y.S., Qi, Y.X., Ye, G.Y. & Huang, J. (2016) A new family of insect muscarinic acetylcholine receptors. *Insect Molecular Biology*, 25(4), 362–369. https://doi.org/10.1111/imb.12229

How to cite this article: Pilon, A., Goven, D. & Raymond, V. (2022) Pharmacological and molecular characterization of the A-type muscarinic acetylcholine receptor from *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, 1–11. Available from: https://doi.org/10.1111/imb.12775

DOCTORAT ECOLOGIE
BRETAGNE GEOSCIENCES
LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

université angers

Titre : Les récepteurs muscariniques peuvent-ils être considérés comme facteur clé dans le développement de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes vecteurs de maladies ?

Mots clés : Insecte ; *Anopheles gambiae* ; Récepteurs muscariniques ; Maladies vectorielles

Résumé : Les maladies vectorielles sont causées par des agents pathogènes transmis d'un hôte à un autre par un insecte vecteur. Le moyen de lutte le plus efficace contre ces maladies reste à l'heure actuelle l'utilisation de produits phytosanitaires comme les insecticides. Cependant, l'utilisation non raisonnée des insecticides au cours des dernières décennies a conduit à l'apparition de populations d'insectes résistants entrainant une diminution de l'efficacité des traitements insecticides. De plus, les politiques institutionnelles tendent vers une diminution du nombre de substances disponibles. Il devient donc nécessaire de mettre en place de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes vecteurs de maladies. Des études chez la blatte *Periplaneta americana* ont montré que l'activation des récepteurs muscariniques (mAChRs) entrainait l'augmentation du calcium intracellulaire. Cette augmentation de calcium permet d'accroître la sensibilité des cibles aux insecticides. Ainsi, les mAChRs pourraient jouer un rôle dans les nouvelles stratégies de lutte contre les insectes nuisibles. Nous avons donc entrepris de caractériser les mAChRs chez le moustique *Anopheles gambiae*, vecteur du paludisme. Trois types de mAChRs ont été mis en évidence : le mAChR-A, deux variants du mAChR-B (mAChR-B1 et mAChR-B2) et le mAChR-C. L'expression du mAChR-A dans un système hétérologue, les cellules *Sf*9, a permis sa caractérisation fonctionnelle et pharmacologique. Des tests de mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase 1 (AChE1) d'*An. gambiae* dans les cellules *Sf*9 ont montré que l'activation du mAChR-A module la sensibilité de l'AChE1 au chlorpyrifos-éthyl, un insecticide organophosphoré. L'ensemble des résultats suggère que les mAChRs peuvent être considérés comme des facteurs importants dans le développement de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes vecteurs de maladie.

Title: Can muscarinic receptors be considered as a new target in vector control strategy?

Keywords: Insect; *Anopheles gambiae*; Muscarinic receptors; Vector-borne disease

Abstract: Vector-borne diseases are caused by pathogen transmission from one host to another by insects. The main way to prevent those diseases is vector control. Chemical pesticides such as insecticides have been used successfully in controlling several pest insects. However, their widespread uses during several decades have led to the emergence of resistance. Moreover, institutional policies tend to be more and more restrictive to the use of insecticides. It is then necessary to develop new strategies to control the insects responsible for these diseases. Previous studies, on the cockroaches *Periplaneta americana*, shown that intracellular calcium increase *via* muscarinic receptors (mAChRs) activation leads to increase the sensitivity of the neuronal target to insecticide. In this work, the study of mAChRs from *Anopheles gambiae*, the main vector of malaria, was performed. Three types of mAChRs have been found and named mAChR-A, mAChR-B (two variants mAChR-B1 and mAChR-B2) and mAChR-C. Using calcium imaging technique, the functional and pharmacological characterisation of mAChR-A expressed in a heterologous system, the *Sf*9 cells, was performed. After co-expression of mAChR-A and *An. gambiae* acetylcholinesterase 1 (AChE1) in *Sf*9 cells, we shown that mAChR-A activation modulates AChE1 sensitivity to an organophosphate insecticide, the chlorpyrifos-ethyl. Taken together, these results suggest that mAChRs can be considered as important factors in the development of new strategies for controlling pest insects.