



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes de compensation moléculaires et cellulaires associés aux résistances ace-1R et kdr pour l'optimisation d'une stratégie de lutte contre les moustiques vecteurs d'agents pathogènes

Stéphane Perrier

► **To cite this version:**

Stéphane Perrier. Etude des mécanismes de compensation moléculaires et cellulaires associés aux résistances ace-1R et kdr pour l'optimisation d'une stratégie de lutte contre les moustiques vecteurs d'agents pathogènes. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université d'Angers, 2021. Français. NNT : 2021ANGE0075 . tel-03953554

**HAL Id: tel-03953554**

**<https://theses.hal.science/tel-03953554>**

Submitted on 24 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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*

Spécialité : « *Biochimie, biologie moléculaire et cellulaire* »

Par

**Stéphane PERRIER**

**Etude des mécanismes de compensation moléculaires et cellulaires associés aux résistances *ace-1<sup>R</sup>* et *kdr* pour l'optimisation d'une stratégie de lutte contre les moustiques vecteurs d'agents pathogènes**

Thèse présentée et soutenue à l'Université d'Angers, le 16/12/2021

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

## Rapporteurs avant soutenance :

M. Philippe LUCAS  
Directeur de recherche,  
INRAE, Versailles

M. Claudio LAZZARI  
Professeur des Universités,  
Université de Tours

## Composition du Jury :

### Directeur de thèse

M. Bruno LAPIED  
Professeur des Universités,  
Université d'Angers

### Co-directeur de thèse

M. Fabrice CHANDRE  
Directeur de recherche,  
IRD Montpellier

### Co-encadrante de thèse

Mme. Caroline DESHAYES  
Maître de conférences,  
Université d'Angers

### Examinatrice

Mme. Isabelle DUSFOUR  
Chargée de recherche  
Institut Pasteur

### Membre invité

Mme. Emmanuelle GUILLOT-COMBE  
Ingénieure cadre  
Ministère des Armées, Agence  
Innovation Défense

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.



## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord l'Agence Innovation Défense ainsi que la Région Pays de la Loire pour m'avoir attribué ce financement qui m'a permis d'effectuer cette thèse.

Merci à Philippe Lucas et Claudio Lazzari d'avoir accepté la révision de ce travail de thèse, à Isabelle Dusfour pour avoir participé au jury de soutenance et à Emmanuelle Guillot-Combe pour avoir été ma tutrice à la DGA pendant ces 3 ans.

Un grand merci à Valérie Raymond pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire SiFCIR et pour m'avoir fait confiance une nouvelle fois. Je me permets aussi de vous remercier pour les victoires écrasantes au paintball.

Bruno Lapied, pour m'avoir encadré depuis le master 1 jusqu'à la fin de ce projet de thèse ! Du chemin aura été parcouru, merci d'avoir cru en moi et d'avoir été un directeur de thèse aussi inspirant que détendu. L'encadrement scientifique et humain a été parfait du début à la fin. Merci d'avoir été toujours présent, disponible et d'être toujours force de proposition en matière de vin pour les repas de Noël. Vous avez tout mon respect et toute ma gratitude. J'ai aimé arriver à ce niveau de réflexion où, comme vous le dites si bien, personne ne comprend ce que l'on fait, même pas nous.

Fabrice Chandre, pour tous les échanges que nous avons pu avoir, en distanciel au départ puis de vive voix lors de mon déplacement à MIVEGEC. Je dois avouer avoir préféré les échanges de vive voix, car la connexion internet à Montpellier semble inégalement répartie. Je vous remercie pour votre encadrement et votre expertise scientifique, ainsi que d'avoir pris la co-direction de cette thèse. Votre expérience m'a permis d'enrichir mes connaissances et compétences scientifiques, tout cela dans un climat serein.

Très chère Caroline Deshayes, je n'oserais m'abaisser à vous tutoyer dans ce paragraphe que je vous dédie. J'eûte simplement voulu vous remercier pour votre encadrement et votre disponibilité tout au long de cette thèse. Avoir la chance de vous côtoyer fut pour moi une grande fierté, j'en ressors grandi. Je vous souhaite, chère encadrante, une excellente continuation professionnelle et personnelle.

Éléonore Moreau merci pour ta participation à ce travail de thèse. C'est toi en effet qui m'a appris en grande partie toutes les manip' que j'ai réalisées pendant ces 5 ans. Surtout, merci d'avoir enrichi la langue française de tes expressions, et pour ta bonne humeur constante. Bonne continuation avec toute ta famille qui s'agrandit !

Julie-Anne Hugel, merci pour ton soutien technique et moral. Merci d'avoir veillé à mon entraînement de cardio avec ton calendrier de l'avent sportif et pour tous ces moments de joie.

Marine, merci pour tes conseils, ta compagnie toujours agréable ainsi que les bonnes adresses de restos ou de randonnée dans et autour de Montpellier. Bon courage pour la suite de tes projets scientifiques et humains.



## REMERCIEMENTS

Je voudrais aussi remercier les autres doctorants du laboratoire. Alexandre Pilon, le pote depuis la L1, toujours présent si besoin, ça fait du bien d'avoir partagé toute cette aventure avec toi sans se sentir seul. Merci et bon courage pour la médecine. Alexandre Bantz, merci d'avoir passé des heures à me conseiller, mais aussi à faire tout sauf travailler. Je pense qu'on peut rajouter doctorat en memes dans l'intitulé de nos thèses. Grâce à toi, j'ai pu apprendre toutes les subtilités du système métrique impérial. Sans pour autant savoir quoi faire de ces informations, je te remercie de les avoir partagées. Javier Pitti-Caballero, merci pour tes conseils et toutes les discussions que nous avons pu avoir. J'irai te voir au Panama sois en sûr mon ami. Sébastien Ligonnière, merci pour l'accueil au labo à mon retour de Montpellier, nous avons eu l'occasion de nous rencontrer tardivement durant ma thèse, mais ce temps partagé fut toujours agréable. Je te souhaite de passer une très bonne thèse et d'atteindre tous tes objectifs professionnels et personnels. Et comme tu dis si bien « hey, 10 minutes en moins, ça fait 10 minutes en plus, enfin en moins... bref tu m'as compris ».

Merci à tous les autres membres du laboratoire SIFCIR. Jérémy Camon et Xavier Leray, les meilleurs ATER, pour les débats, les discussions philosophiques/métaphysiques et votre soutien. Josy-Anne Froger pour les conseils, les danses et les chants en salle de pause ou de biologie moléculaire. Véronique Marchais, Véronique Jean, Delphine Goven, Luzia Bossé, Corinne Lefrançois pour les discussions scientifiques ou non et les conseils.

A MIVEGEC, Frédéric Simard pour l'accueil, tous les personnels du laboratoire qui m'ont pris sous leur aile dès le début.

Marie Rossignol, pour m'avoir encadré techniquement lors de mon arrivée au laboratoire.

Bethsabée Sheid, Stéphane Duchon, Frédéric Darriet pour vos conseils.

Carole Ginibre pour les discussions et pour avoir bichonné les petits moustiques.

Merci à tous d'avoir été aussi disponibles.

Merci à Lison Laroche, Paul Taconet, Justine Boutry, Adeline Valente, Fanny Borveto, Fiona Lebay pour m'avoir intégré aussi rapidement et pour que je trouve le chemin de la cantine alors que j'arrivais de ma cambrousse angevine. Les portes de la maison vous sont grandes ouvertes ! A vous de venir maintenant.

Ce qu'il y a autour de la thèse et du labo est aussi important.

Merci à la famille Moutier, qui se reconnaîtra, d'avoir partagé de super moments et des pez. Les potes, j'ai la chance d'en avoir beaucoup alors je ne vais pas remercier tout le monde un par un. Sachez que votre soutien et tous les moments partagés ensemble ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail. Et les rôlistes, j'arrive à Kando. Une mention spéciale à Axel et Antoine, on peut presque parler de frères à ce niveau-là, merci tout simplement d'être présents dans ma vie.

# REMERCIEMENTS

Merci à l'ensemble de ma famille. Merci de vous être intéressé au projet sans vraiment faire partie du domaine et d'avoir toujours été là pour me soutenir.

Sully, mon super chat, aussi beau que bête qui m'a empêché de dormir de nombreuses nuits pour que je n'arrive pas en retard le matin.

Manu, ma chérie, ma ninette, ma "insérer ici les 724 surnoms débiles que j'ai pu inventer pendant nos presque 5 ans de relation", merci pour ton soutien tout au long de ce projet, pour la patience dont tu as fait preuve lors des périodes intenses de travail et de stress. Merci d'être restée une personne extraordinaire et aimante durant ces trois ans, avec cette période à distance que nous avons / tu as su gérer. Je suis heureux d'avoir trouvé cette complicité avec quelqu'un. Tu représentes le pilier sur lequel je peux m'appuyer pour avancer et j'espère être capable de la même chose pour toi. Merci d'avoir été toi, tout simplement, à l'écoute, généreuse, déterminée. Je t'aime toi.

Christophe, mon frerot, mon mongol, mon petit militaire, je te souhaite de t'épanouir à fond avec Elo et toute ta famille. Même si on n'est pas toujours en contact étroit, je sais qu'à chaque fois que l'on se voit, rien n'a changé et rien ne changera jamais. Merci à toi.

Papa, mon papounet, mon moustachu, mon héros, mon grand militaire, merci pour ton soutien sans faille et plus largement pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Je pense que peu d'enfants ont la chance d'avoir un père comme toi. Maintenant, c'est à nous de te soutenir dans tes choix et pour la suite de ta vie de jeune retraité. Eclate toi avec Nathalie et Léo, c'est un ordre mon adjudant-chef.

Maman, j'espère que tu es fier de ton/tes fils, je suis certain que les nuages sont bien trop fins pour que tu aies raté une seconde de ces trois ans. C'est en partie grâce à l'éducation de nos parents qu'on a l'opportunité de réaliser nos rêves, et nous avons toujours eu la liberté et le confort pour le faire. Merci.

Je vous aime plus que tout et je vous dédie ce travail.

# Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>10</b>
<b>PREAMBULE .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>14</b>
<b>CHAPITRE 1 : LES ANOPHELES : VECTEUR DU PALUDISME.....</b>	<b>14</b>
<b>1. Le paludisme .....</b>	<b>14</b>
<b>2. Les anophèles.....</b>	<b>16</b>
2.1. Taxonomie .....	16
2.2. Cycle de vie .....	17
2.3. Rôle dans la transmission du paludisme .....	19
<b>3. Cas particulier des forces armées françaises.....</b>	<b>20</b>
<b>CHAPITRE 2 : PROTECTION PERSONNELLE ET CONTROLE DES POPULATIONS DE MOUSTIQUES VECTEURS .....</b>	<b>24</b>
<b>1. Protection personnelle : les répulsifs .....</b>	<b>24</b>
1.1. Avant-propos .....	24
1.2. Mode d'action des répulsifs .....	25
1.2.1. Système neurosensoriel du moustique .....	26
1.2.1.1. Système olfactif du moustique .....	26
1.2.1.2. Système gustatif du moustique .....	28
1.2.2. Effets classiques des répulsifs chez l'insecte.....	30
1.2.3. Effets atypiques des répulsifs chez les insectes .....	32
<b>2. Contrôle des populations de vecteurs : les insecticides .....</b>	<b>33</b>
2.1. Avant-propos .....	33
2.2. La lutte chimique.....	34
2.2.1. Les insecticides ciblant l'acétylcholinestrase.....	36
2.2.2. Les insecticides ciblant les canaux sodiques dépendants du potentiel .....	38
2.2.3. Les insecticides ciblant les récepteurs cholinergiques de type nicotinique .....	41
<b>CHAPITRE 3 : LA RESISTANCE VIS-A-VIS DES INSECTICIDES ET REPULSIFS UTILISES EN LAV .....</b>	<b>48</b>
<b>1. Mécanismes de résistance aux insecticides .....</b>	<b>50</b>
1.1. Résistance métabolique.....	50
1.2. Mutation des cibles d'insecticides.....	52
1.3. Résistance cuticulaire.....	56
1.4. Séquestration des insecticides.....	58
1.5. Changements comportementaux .....	58
<b>2. Mécanismes impliqués dans la réduction de l'efficacité des répulsifs .....</b>	<b>61</b>
<b>3. Impact des résistances dans les populations de vecteurs .....</b>	<b>62</b>
<b>CHAPITRE 4 : LES ASSOCIATIONS INSECTICIDE/AGENT SYNERGISANT POUR CONTOURNER LES PHENOMENES DE RESISTANCE .....</b>	<b>64</b>
<b>1. L'utilisation d'un agent synergisant pour potentialiser l'effet des insecticides .....</b>	<b>64</b>
1.1. Le principe de l'agent synergisant.....	64
1.2. L'importance du calcium intracellulaire dans la potentialisation de l'effet insecticide..	66
1.3. La différence synergiste / agent synergisant .....	69

<b>2.</b>	<b>Les associations synergiques .....</b>	<b>70</b>
2.1.	La combinaison de deux insecticides .....	70
2.2.	La combinaison virus / insecticide.....	73
2.3.	La combinaison répulsif / insecticide .....	75
<b>CHAPITRE 5 : OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE .....</b>		<b>80</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>		<b>82</b>
<b>CHAPITRE 1 : MODELE BIOLOGIQUE : ANOPHELES GAMBIAE S.S., SOUCHES SENSIBLES ET RESISTANTES.....</b>		<b>82</b>
<b>1.</b>	<b>Souches de moustique.....</b>	<b>82</b>
<b>2.</b>	<b>Elevage des moustiques .....</b>	<b>83</b>
<b>CHAPITRE 2 : TECHNIQUES UTILISEES IN VITRO SUR NEURONES ISOLES DE MOUSTIQUES SENSIBLES ET RESISTANTS .....</b>		<b>84</b>
<b>1.</b>	<b>Caractéristiques des neurones isolés de moustiques.....</b>	<b>84</b>
<b>2.</b>	<b>Technique de dissociation des neurones de moustiques.....</b>	<b>85</b>
<b>3.</b>	<b>Technique électrophysiologique du patch-clamp .....</b>	<b>86</b>
3.1.	Principe de la technique .....	86
3.2.	Dispositif d'enregistrement .....	89
3.3.	Conditions expérimentales en potentiel imposé .....	91
3.4.	Conditions expérimentales en courant imposé.....	93
3.5.	Composition des solutions .....	94
<b>4.</b>	<b>Technique d'imagerie calcique .....</b>	<b>96</b>
4.1.	Principe.....	96
4.2.	Dispositif d'enregistrement .....	97
4.3.	Composition des solutions .....	99
<b>5.</b>	<b>RT-qPCR.....</b>	<b>99</b>
5.1.	Principe.....	99
5.2.	Protocole et amorces .....	100
<b>CHAPITRE 3 : TEST DE L'ACTIVITE LARVICIDE DES ASSOCIATIONS INSECTICIDE/REPULSIF IN VIVO SUR LARVES DE MOUSTIQUES SENSIBLES ET RESISTANTS.....</b>		<b>102</b>
<b>1.</b>	<b>Principe .....</b>	<b>102</b>
<b>2.</b>	<b>Protocole et solutions.....</b>	<b>102</b>
<b>3.</b>	<b>Analyse des résultats .....</b>	<b>104</b>
3.1.	Calcul des concentrations létales d'insecticides à 24 et 48h sur les larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis.....	104
3.2.	Evaluation de la synergie entre le répulsif IR3535 et les insecticides sur les larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis.....	105
<b>RESULTATS .....</b>		<b>106</b>
<b>CHAPITRE 1 : PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DES NEURONES ISOLES DE MOUSTIQUES KIS ACERKIS ET KDRKIS .....</b>		<b>108</b>
<b>1.</b>	<b>Effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.....</b>	<b>108</b>
1.1.	Propriétés du courant ionique induit par l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis .....	108
1.2.	Dépendance vis-à-vis de la concentration de l'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis .....	110
<b>2.</b>	<b>Influence de la mutation ace-1<sup>R</sup> sur les propriétés électropharmacologiques des neurones isolés de moustiques AcerKis .....</b>	<b>113</b>

2.1. Origine de la différence d'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques AcerKis .....	113
2.1.1. Implication de l'AChE dans l'augmentation de l'amplitude du courant induit par l'ACh dans les neurones de moustiques AcerKis .....	113
2.1.2. Mise en évidence de l'expression d'une population différente de nAChRs dans les neurones isolés de moustiques AcerKis.....	115
2.1.3. Propriétés des courants capacitifs mesurés sur les neurones de moustiques Kis et AcerKis.....	117
2.2. Propriétés électrophysiologiques des nAChRs exprimés par les neurones AcerKis ....	119
2.2.1. Implication du calcium extracellulaire dans l'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis .....	120
2.2.1.1. Participation des canaux calciques dépendants du potentiel dans l'effet de l'ACh sur les neurones AcerKis .....	120
2.2.1.2. Perméabilité au calcium des nAChRs exprimés dans les neurones isolés de moustiques AcerKis .....	126
2.2.2. La nicotine permet-elle de discriminer les nAChRs exprimés par les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ? .....	130
<b>3. Influence de la mutation <i>kdr</i> sur les propriétés électropharmacologiques des neurones de moustiques KdrKis.....</b>	<b>133</b>
3.1. Caractérisation des propriétés biophysiques des Na <sub>v</sub> des neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis .....	133
3.1.1. Propriétés biophysiques de la phase d'activation du courant sodique .....	134
3.1.2. Propriétés biophysiques du courant sodique maintenu en fin d'impulsion dépolarisante .....	138
3.2. Influence de la concentration basale en calcium sur les neurones isolés de moustiques KdrKis .....	141
3.2.1. Détermination du potentiel de membrane dans les neurones isolés de moustiques KdrKis .....	141
3.2.2. Influence du potentiel de membrane sur les propriétés biophysiques des canaux calciques dépendants du potentiel dans les neurones isolés de moustiques KdrKis .....	142
3.2.3. Influence de la concentration basale en calcium sur le courant induit par l'ACh dans les neurones isolés de moustiques KdrKis .....	143
<b>CHAPITRE 2 : EFFETS DES INSECTICIDES DE TYPE NEONICOTINOÏDES ET MESOIONIQUES QUI AGISSENT SUR LES RECEPTEURS NICOTINIQUES DES NEURONES ISOLES DE MOUSTIQUES KIS, ACERKIS ET KDRKIS .....</b>	<b>145</b>
<b>1. Effet de la clothianidine sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis .....</b>	<b>145</b>
1.1. Caractérisation du courant ionique entrant induit par la clothianidine sur les neurones isolés de moustique Kis, AcerKis et KdrKis .....	145
1.2. Dépendance vis-à-vis de la concentration de l'amplitude du courant induit par la clothianidine dans les neurones isolés de moustiques Kis.....	146
1.3. Effet de la clothianidine sur les variations de calcium dans les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.....	148
<b>2. Effet du triflumézopyrime sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis .....</b>	<b>149</b>
2.1. Effet du triflumézopyrime sur l'amplitude du courant induit par l'ACh dans les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.....	149
2.2. Effet du triflumézopyrime sur les variations de calcium induites par l'ACh dans les neurones isolés de moustiques KdrKis .....	151

<b>CHAPITRE 3 : EVALUATION <i>IN VIVO</i> DE L'EFFET SYNERGIQUE DE L'IR3535 ASSOCIE A DES INSECTICIDES CIBLANT LES RECEPTEURS NICOTINIQUES SUR LES LARVES DE MOUSTIQUES Kis, ACERKIS ET KDRKIS.....</b>	<b>153</b>
<b>1. Effet des insecticides néonicotinoïdes et mésoioniques sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.....</b>	<b>154</b>
1.1. Evaluation de l'efficacité de la clothianidine seule sur des larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis .....	154
1.2. Evaluation de l'efficacité du triflumézopyrime seul sur des larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis .....	156
<b>2. Effet des combinaisons d'insecticides néonicotinoïdes et mésoioniques avec l'IR3535 sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.....</b>	<b>158</b>
2.1. Evaluation de l'efficacité de l'IR3535 seul sur la mortalité des larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis .....	158
2.2. Effet synergique d'une combinaison de la clothianidine avec l'IR3535 sur des larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis .....	160
2.2.1. Association de la clothianidine à la CL <sub>50</sub> avec IR3535 .....	160
2.2.2. Association de la clothianidine à la CL <sub>30</sub> avec IR3535 .....	163
2.3. Effet synergique d'une combinaison de triflumézopyrime avec l'IR3535 sur des larves de moustiques Kis.....	166
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>168</b>
<b>1. Les mécanismes de compensation : une nouvelle manière de considérer les mécanismes de résistance .....</b>	<b>168</b>
<b>2. L'IR3535 comme agent synergisant : optimisation de l'effet des insecticides qui agissent sur les nAChRs .....</b>	<b>175</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>180</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>206</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>211</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>213</b>
<b>ANNEXE 2.....</b>	<b>227</b>

## Liste des abréviations

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentration en calcium intracellulaire
ABC	ATP binding cassette
<i>ace-1<sup>R</sup></i>	résistance <i>ace-1</i>
AcerKis	Souche Kis présentant la résistance <i>ace-1<sup>R</sup></i>
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
AD	Amplificateur différentiel
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOP	Amplificateur opérationnel
ATP	Adénosine triphosphate
CaMKII	Calcium/calmoduline kinase de type II
Cav	Canal calcium dépendant du potentiel
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CdCl <sub>2</sub>	Chlorure de cadmium
CL	Concentration létale
CLO	Clothianidine
Cm	Capacité membranaire
CNEV	Centre National d'Expertise sur les Vecteurs
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CX	Carbamates
DAG	Diacylglycérol
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DEET	N,N-Diéthyl-m-toluamide
DEF	S,S,S-tributyl phosphorotrithioate
DL	Dose létale
EGTA	Ethylène glycol tétraacétate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HVA	Haut seuil d'activation
IC	Intervalle de confiance
IP <sub>3</sub>	Inositol trisphosphate
IP <sub>3</sub> R	Récepteur à l'IP <sub>3</sub>
IR3535	Insect repellent 3535 ou éthylbutylacétylaminopropionate
IRD	Institut de recherche pour le développement
IRS	Indoor residual spraying

## Liste des abréviations

ITN	Insecticide-treated nets
KBR 3023	Icaridine ou picaridine
<i>kdr</i>	Knock-down resistance
KdrKis	Souche Kis présentant la mutation <i>kdr</i>
Kis	Kisumu
LAV	Lutte anti-vectorielle
LLIN	Long-lasting insecticide-treated nets
Lynx	Ly-6/neurotoxin
mAChR	Récepteur cholinergique de type muscarinique
MIVEGEC	Laboratoire des Maladies Infectieuses et Vecteurs Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle
nAChR	Récepteur cholinergique de type nicotinique
Nav	Canal sodium dépendant du potentiel
Neurones DUM	Dorsal Unpaired Median neurone
NO	Monoxyde d'azote
NRG	Neurone récepteur gustatif
NRO	Neurone récepteur olfactif
OBP	Protéine olfactive de transport
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OP	Organophosphorés
OPEX	Opération extérieure
PA	Potentiel d'action
PBO	Piperonyl butoxide
PCR	Polymerase chain reaction
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine kinase dépendante du calcium
PKG	Protéine kinase dépendante du GMPc
PLC	Phospholipase C
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RG	Récepteur gustatif
RI	Récepteur ionotrope
RIC-3	Résistance à l'inhibiteur de l'acétylcholinestérase-3
Rm	Résistance membranaire
RO	Récepteur olfactif
RTK	Récepteur tyrosine kinase
RyR	Récepteur à la ryanodine



## Liste des abréviations

S.E.M.	Standard error of the mean
SAP	Sensory apendage protein
SiFCIR	Laboratoire Signalisation fonctionnelle des canaux ioniques et récepteurs
TRIF	Triflumézopyrime
TRPC	Transient receptor potential type C channels
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
$\alpha$ -bgt	$\alpha$ -bungarotoxine

## Préambule

Les changements environnementaux et sociétaux influencent la distribution et la dynamique des agents pathogènes et de leurs moustiques vecteurs contribuant à l'émergence ou la réémergence d'épidémies de maladies vectorielles (paludisme, dengue, chikungunya et Zika) dont les impacts sanitaires sont considérables. Pour la plupart de ces maladies, il n'existe pas de vaccin et le plus souvent pas de traitement. La lutte chimique demeure donc la principale stratégie pour contrôler les populations de moustiques vecteurs. Cependant, l'utilisation intensive de substances biocides a pour impact la sélection de moustiques résistants vis-à-vis des insecticides comme les pyréthrinoïdes, pourtant recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). C'est dans ce contexte particulier que s'inscrit notre projet de recherche. La 6<sup>ème</sup> conférence du Fond Mondial tenue en 2019 a mis en avant le paludisme comme l'une des trois pathologies mondiales les plus préoccupantes avec le sida et la tuberculose. Il est donc primordial de limiter les contacts avec les moustiques vecteurs d'agents pathogènes en utilisant des substances chimiques imprégnées sur divers textiles (habits, toiles de tente, moustiquaires, treillis...). Aujourd'hui, dans le cadre de cette lutte anti-vectorielle (LAV), la plupart des textiles sont imprégnés d'insecticides pyréthrinoïdes, possédant une action à la fois insecticide et répulsive, ainsi que d'organophosphorés (OP) et de carbamates (CX). Malheureusement, l'apparition de résistances au sein des populations de moustiques remet en cause leurs efficacités et donc leurs utilisations.

L'objectif de cette thèse est de développer deux nouvelles stratégies de lutte chimique contre *Anopheles gambiae*, le principal vecteur du paludisme en Afrique, pour contourner les phénomènes de résistance par mutation de la cible d'insecticide. Nous avons travaillé simultanément sur une souche sensible de référence et deux souches résistantes aux insecticides. L'une présente la mutation G119S sur l'acétylcholinestérase qui confère la résistance aux insecticides OP et CX et l'autre présente la mutation L1014F sur le canal sodium dépendant du potentiel qui confère la résistance aux insecticides pyréthrinoïdes. Dans les stratégies proposées à l'issue de nos résultats, un répulsif (IR3535) est utilisé en tant qu'agent synergisant pour augmenter la sensibilité des récepteurs cholinergiques de type nicotinique à la clothianidine, un insecticide néonicotinoïde, et au triflumézopyrime, un insecticide mésoionique. Ces insecticides ne sont que peu ou pas utilisés en LAV et leur mode d'action est donc totalement nouveau dans ce contexte.

# Introduction

## Chapitre 1 : Les anophèles : vecteur du paludisme

### 1. Le paludisme

Le paludisme, autrement appelé malaria ou fièvre des marais, est une maladie parasitaire principalement tropicale et subtropicale transmise par les moustiques du genre *Anopheles* au moment de la prise du repas sanguin. L'infection est causée par des parasites unicellulaires du genre *Plasmodium*. Il existe plus de 100 espèces de microorganismes du genre *Plasmodium* infectant des reptiles, oiseaux ou mammifères, cependant seulement 6 espèces sont capables d'infecter les humains et de causer le paludisme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae*, et occasionnellement *P. knowlesi*. Cela donne lieu à différents types de paludisme de gravité plus ou moins forte selon le parasite et selon son cycle de vie (Institut Pasteur, 2013 ; CDC 2020). Les enfants âgés de moins de 5 ans sont les principales victimes puisqu'ils représentent 67% des décès dus à cette maladie (OMS, 2020). De plus, les femmes enceintes, les personnes séropositives ainsi que les migrants/voyageurs non immunisés sont plus susceptibles de la contracter.

Le paludisme sévit principalement en Afrique sub-saharienne où surviennent la plupart des cas et des décès, mais aussi en Asie du Sud-Est, en Méditerranée orientale, dans le Pacifique occidental et aux Amériques (**Figure 1**) (OMS, 2019). Parmi les espèces responsables du paludisme chez l'homme, *P. falciparum* et *P. vivax* sont les plus dangereuses. *P. falciparum*, le plus pathogène, est responsable de 99,7 % des cas estimés dans la Région africaine, de 50 % des cas dans la Région de l'Asie du Sud-Est, de 71 % dans la Région de la Méditerranée orientale et de 65 % dans la Région du Pacifique occidental. *P. vivax*, le plus répandu, est responsable de 53% des infections en Asie du Sud-Est et de 75% des cas en Amérique, où il est prédominant (OMS, 2020). Le paludisme à *P. falciparum* évolue très rapidement vers des formes sévères voire fatales sans traitement. En 2019, le nombre de décès dû au paludisme a été estimé à 409 000 en 2019, soit environ 1120 par jour, contre 422 000 en 2017 et 594 000 en 2010. Il est reporté que 94% de ces décès sont localisés dans la région africaine. L'incidence du paludisme (i.e. nombre de cas pour 1000 habitants exposés au risque de paludisme) a reculé au niveau mondial, passant de 80 en 2000 à 58 en 2015, puis 57 en 2019. De 2000 à 2015, cette dernière a donc

diminué de 27% au niveau mondial, mais de 2 % seulement entre 2015 et 2019, ce qui reflète un net ralentissement depuis 2015 (OMS, 2020). Depuis 2015, l'Europe n'a déclaré aucun cas autochtone.

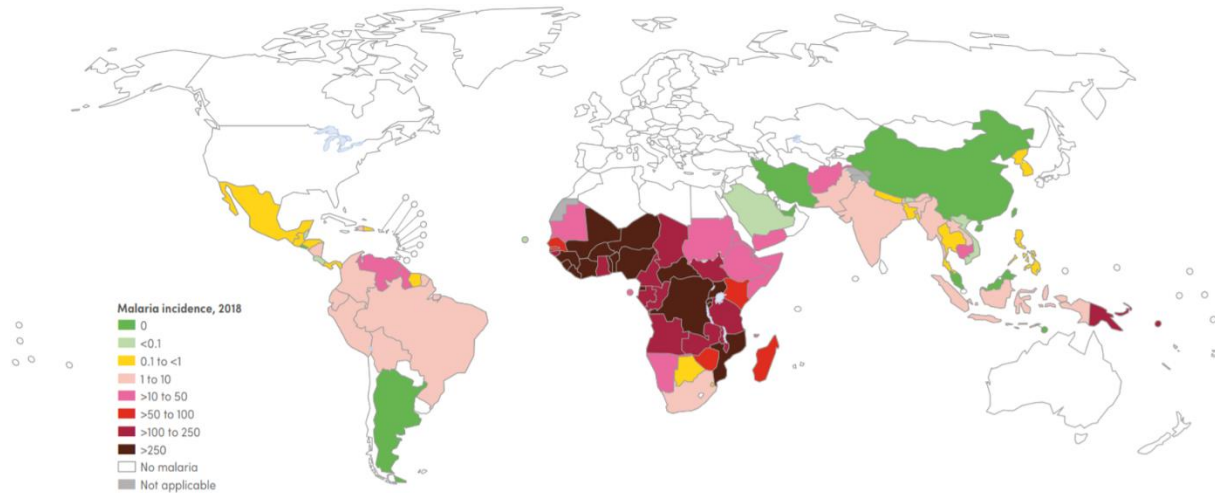


Figure 1 : Répartition géographique indiquant le nombre de cas de paludisme pour 1000 personnes à risque (OMS, 2019).

Même dans les zones endémiques, il est rare de constater des cas de paludisme durant les saisons froides, dans les déserts et à haute altitude. En revanche, les zones plus chaudes sont propices à la transmission des parasites car elles sont compatibles avec l'activité et le développement du parasite (15°C pour *P. vivax*, 20°C pour *P. falciparum*) mais aussi avec l'activité optimale et le cycle de développement des espèces de moustiques vectrices. *P. falciparum* est retrouvé dans les zones tropicales et subtropicales partout dans le monde mais surtout en Afrique comme précisé précédemment. Les premiers symptômes sont généralement difficiles à attribuer à cette maladie. L'infection est quasi-systématiquement fébrile avec d'autres symptômes comme des douleurs musculaires, des frissons, des nausées et des céphalées. De plus, les infections peuvent être asymptomatiques à cause d'une immunisation partielle dans les zones endémiques. Il cause une fièvre tierce (tous les trois jours) maligne dans les cas les plus sévères car il se multiplie rapidement dans le sang, causant des anémies ou bouchant les vaisseaux sanguins. Cela peut être fatal dans le cas où le parasite atteint le cerveau, on parle alors de paludisme cérébral (Ghazanfari *et al.*, 2018). La période entre la piqûre par le moustique infecté et l'apparition des premiers symptômes de la maladie chez l'homme est appelée période d'incubation. Elle dure entre 7 et 30 jours selon le parasite, l'âge, et l'immunité de l'hôte (CDC, 2020 ; OMS, 2021).

Le cycle de vie des parasites du genre *Plasmodium* nécessite deux hôtes, l'homme pour la phase asexuée en tant qu'hôte intermédiaire et le moustique pour la phase sexuée en tant qu'hôte définitif. Les moustiques femelles piquent un hôte humain malade ou porteur asymptomatique et s'infectent avec le parasite. Le parasite progresse alors dans son cycle de développement et une fois qu'il a migré dans les glandes salivaires, le moustique devient infectieux peut injecter des sporozoïtes (cellules infectieuses) dans le sang et le derme d'un hôte humain par une piqûre lors d'un repas de sang ultérieur.

## 2. Les anophèles

### 2.1. Taxonomie

Le moustique appartient à l'ordre des *Diptera*, caractérisé par une seule paire d'ailes membraneuses, et à la famille des *Culicidae*, qui est séparée en deux sous-familles (**Figure 2**). La plupart des moustiques appartiennent à la sous-famille des *Culicinae* (*Aedes*, *Culex* etc...). Cependant, de nombreux moustiques d'intérêt en santé publique appartiennent à la sous-famille des *Anophelinae*, dans laquelle sont classées les espèces vectrices de paludisme.



Figure 2 : Photographies de 3 espèces représentatives des deux sous-familles de moustiques (banque d'images du CDC, 2020).

Il existe environ 3500 espèces de moustiques dont 500 espèces d'anophèles (Harbach, 2013). Les anophèles sont présentes quasiment partout dans le monde. Il est reporté que 70 espèces environ sont capables de transmettre le paludisme à l'homme (Sinka *et al.*, 2012). Les

vecteurs majeurs en Afrique sub-saharienne appartiennent à deux complexes d'espèces : *Anopheles gambiae s.l.*<sup>1</sup> et *Anopheles funestus s.l.*<sup>2</sup>

## 2.2. Cycle de vie

Les moustiques sont des insectes holométaboles qui suivent une métamorphose complète passant par 4 grands stades bien définis et séparés morphologiquement (**Figure 3**). Les trois premiers stades, œuf, larve et nymphe (ou pupa) sont aquatiques. Le stade adulte ou imago est aérien.

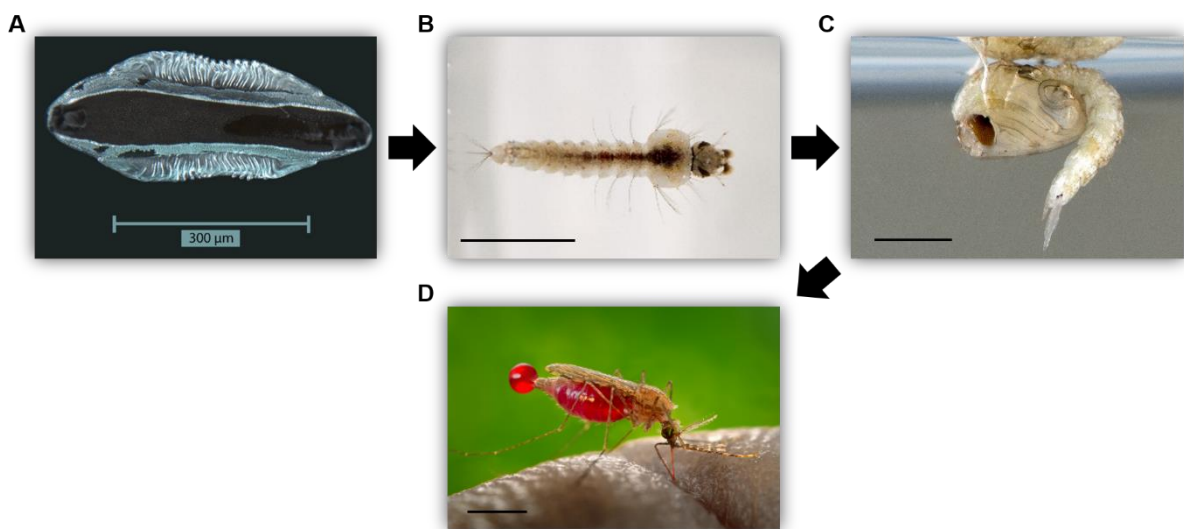


Figure 3 : Photographies de A) la face ventrale d'un œuf, B) de la face dorsale d'une larve, C) de la face latérale d'une nymphe et D) d'un adulte *An. gambiae*. Echelle : 0,25cm. Photo prise par Nil Rahola, MIVEGEC IRD Montpellier.

Le cycle de vie des anophèles dure entre 7 et 14 jours depuis l'œuf jusqu'à l'adulte. Le cycle complet est illustré en **figure 4** (Carnevale et Robert, 2009).

---

<sup>1</sup> Contient 8 espèces cryptiques, notamment *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* et *An. coluzzi* (Coetzee et al., 2013). *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont les principaux vecteurs de *P. falciparum*.

<sup>2</sup> Contient 9 espèces notamment *An. funestus s.s.*, *An. parensis*, *An. rivulorum* et *An. lesoni*.

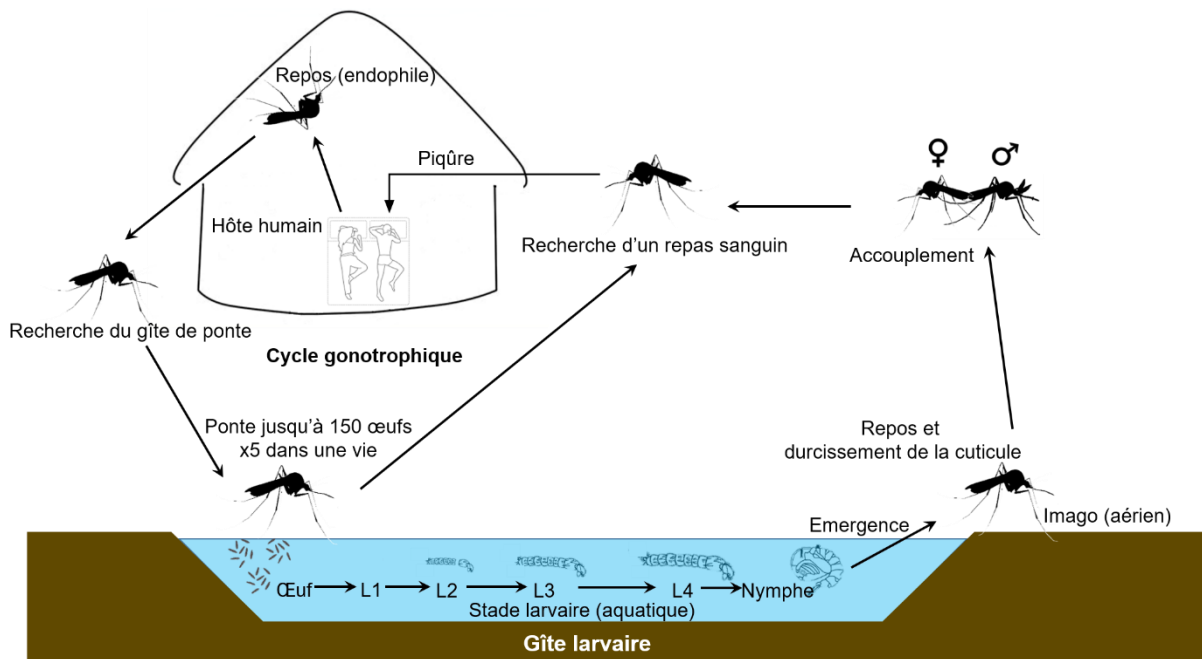


Figure 4 : Cycle de développement des anophèles (Modifié d'après Carnevale et Robert, 2009).

Au stade imaginal, la nutrition du mâle s'appuie uniquement sur des sources de sucre comme la sève, le miellat ou des fruits endommagés tandis que la femelle est aussi hématophage (Foster, 1995; Gary et Foster, 2004; Barredo et Degennaro, 2020). Le repas sanguin constitue un enjeu majeur en santé publique car c'est à ce moment que le moustique peut être infecté par des plasmodies et devenir infectieux après la période extrinsèque d'incubation (EIP). L'EIP est le temps nécessaire au parasite pour passer de l'intestin aux glandes salivaires. Elle dure une douzaine de jours pour *P. falciparum* (Ohm *et al.*, 2018). La prise d'un repas sanguin par la femelle est nécessaire à la vitellogenèse qui permet de créer des réserves énergétiques utilisées par l'embryon pendant son développement. Le repas sanguin est donc indispensable à la maturation des œufs. Après ingestion du sang, la femelle est dite gorgée et va chercher un endroit pour digérer, excréter les déchets métaboliques (diurèse) et se reposer. Généralement le repos se fait à l'intérieur des habitations et dure 35 à 40h chez *An. gambiae*, ce temps est allongé à mesure que la température diminue. Les anophèles prennent alors une position caractéristique avec un angle de 45° et la 3<sup>ème</sup> paire de patte relevée. Une fois le sang digéré, la femelle est dite gravide (Carnevale et Robert, 2009).

### 2.3. Rôle dans la transmission du paludisme

*An. gambiae s.s.* est le principal vecteur de paludisme en Afrique pour plusieurs raisons. Premièrement, la femelle d'*An. gambiae s.s.* est endophile et anthropophile. Le comportement très anthropophile d'*An. gambiae s.s.* est défini par 1) sa préférence pour les humains en tant qu'hôte pour la prise de repas sanguin par rapport aux oiseaux ou autres mammifères (zoophilie), 2) par son endophagie et son endophilie, c'est-à-dire sa tendance à piquer et à se reposer à l'intérieur des habitations après la piqûre, 3) sa tendance à pondre non loin des habitations (Kabbale *et al.*, 2013; Takken et Verhulst, 2013). Deuxièmement, *An. gambiae s.s.* présente une importante capacité vectorielle pour *P. falciparum*. La capacité vectorielle se définit comme le nombre de piqûres infectantes qu'une population anophélienne distribue quotidiennement à l'homme, en un temps et en un endroit donné (Garrett-Jones, 1964). Depuis plus récemment, la capacité vectorielle inclut la compétence vectorielle qui elle-même dépend des facteurs intrinsèques de l'insecte comme sa physiologie, son système immunitaire, le comportement de piqûre et de repos, la durée du cycle sporogonique qui favorisent l'infection par les plasmodies et la complétion de leur cycle jusqu'à la transmission à un nouvel hôte humain. Enfin, la femelle a tendance à piquer la nuit pendant les heures de sommeil des humains, entre 23h et 6h, mais le cycle d'agressivité peut commencer dès 18h, lorsque l'humidité augmente et que la température baisse (Carnevale et Robert, 2009; Kabbale *et al.*, 2013). Elle a aussi tendance à se nourrir à l'intérieur des habitations (endophagie). Cependant, ce schéma de piqûre peut être influencé par divers facteurs. En effet, les heures de piqûres peuvent être décalées plus tôt ou plus tard suite au déploiement de moustiquaires imprégnées d'insecticides et que l'exophagie est favorisée dans ce cas (Russell *et al.*, 2011a; Reddy *et al.*, 2011; Moiroux *et al.*, 2014).

Lors de la recherche d'un hôte potentiel, celui-ci est repéré à longue distance par le moustique grâce aux odeurs portées par les courants d'airs jusqu'aux chémorécepteurs présents sur les antennes de l'insecte. Les composés attractants comprennent l'acide lactique, le dioxyde de carbone et certaines molécules contenues dans la sueur. Le système neurosensoriel du moustique sera précisément décrit plus loin dans ce manuscrit (**cf. Introduction, chapitre 2, partie 1.2.1.**). Sur de courtes distances (quelques mètres), la perception des formes et des couleurs est favorisée pour repérer l'hôte *via* les yeux composés (Eneh, 2016).



### 3. Cas particulier des forces armées françaises

Sur l'année 2021, plus de 17000 militaires français sont déployés hors métropole que ce soit 1) les forces de souveraineté aux Antilles, en Guyane, à Mayotte, à la Réunion ou en Polynésie française (7150 militaires) 2) les forces de présence en Côte d'Ivoire, au Sénégal, au Gabon, à Djibouti et aux Emirats Arabes Unis (3750 militaires), 3) les forces des opérations Barkhane au G5 Sahel : Mauritanie, Mali, Tchad, Niger, Burkina Faso (5100 militaires). De plus, l'Etat a annoncé en mars 2020 le déploiement de la force européenne Takuba pour appuyer les soldats maliens (500 militaires) (defense.gouv.fr, 2021) (**Figure 5**). La force Takuba a commencé sa mission depuis l'automne 2020.

Les personnels militaires pré-positionnés (missions dans les territoires français d'outre-mer) et en opérations extérieures (OPEX) sont particulièrement exposés aux maladies infectieuses. Ces missions se caractérisent par leur localisation en zone intertropicale. Dans la majorité des pays concernés, l'hygiène générale est mauvaise, les infrastructures sanitaires sont peu nombreuses et les insectes vecteurs d'agents pathogènes sont présents en forte densité. Le personnel militaire est donc très exposé par le contact avec les autochtones ou l'environnement. Les contaminations en OPEX ou mission outre-mer peuvent en plus donner lieu à des cas d'importation lors du retour en métropole.

Les militaires sont principalement exposés aux maladies transmises par l'eau et les aliments, elles sont multiples et polymorphes. Le symptôme prédominant est la diarrhée (77% des cas de maladies infectieuses en 2015). En OPEX, les diarrhées sont le premier motif de consultation médicale. En deuxième lieu viennent les maladies vectorielles puis les maladies sexuellement transmissibles (**Tableau 1**) (Aoun *et al.*, 2014; Santi-Vuillemin, 2018).

Bien que le paludisme ne soit pas la maladie majoritaire chez les militaires déployés, elle fait partie des maladies les plus invalidantes sur le terrain opérationnel. Le paludisme est donc la maladie majeure nuisant aux OPEX, sans être la plus fréquente. La plupart des pays où les militaires sont déployés sont situés en zones endémiques au sein desquelles la transmission des maladies vectorielles reste peu contrôlée (**cf. Figure 1**) (Migliani *et al.*, 2008; Créach *et al.*, 2016).

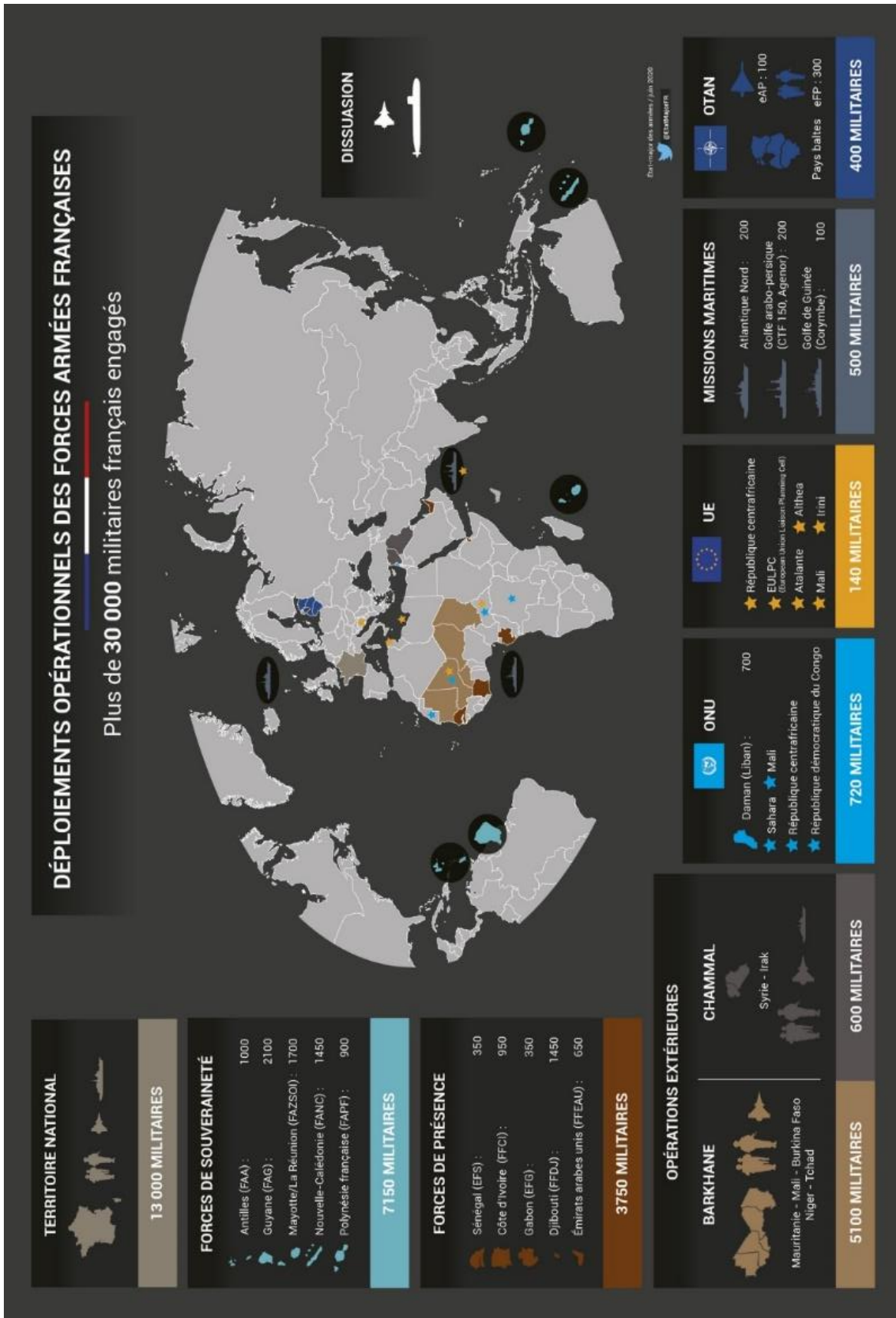


Figure 5 : Carte des déploiements opérationnels des forces armées françaises en 2020 (defense.gouv.fr, 2021).

Catégorie	Maladie infectieuse	Nombre de cas
<b>Maladies transmises par l'eau et les aliments</b>	Diarrhée	4179
	Toxi-infection alimentaire collective	242
	Shigellose / dysenterie	5
	Fièvre typhoïde et paratyphoïde	1
	Amibiase	8
<b>Maladies vectorielles</b>	Syndrome dengue-like	198
	Leishmaniose cutanée	19
	<b>Paludisme</b>	<b>298</b>
<b>Maladies sexuellement transmissibles</b>	Exposition sexuelle à risque	316
	Infection VIH	7
	Autres infections sexuellement transmissibles	120

Tableau 1 : Importance relative des maladies infectieuses touchant les militaires français en 2015 (Santi-Vuillemin, 2018).

Malgré la diminution de l'incidence du paludisme au niveau mondial, cette maladie reste dangereuse, particulièrement au sein des forces armées françaises. De 2000 à 2015, plus de 6400 cas de paludisme ont été reportés parmi les forces armées françaises. L'incidence du paludisme chez les militaires français de 2000 à 2015 est représentée en **figure 6**, les données illustrées comprennent les cas autochtones et d'importation (Velut *et al.*, 2018). Chaque pic de cas observé correspond au lancement d'une opération militaire en pays endémique (Opération « Licorne » en Côte d'Ivoire, lancée fin 2002 ; Opération « Harpie » en Guyane, lancée en 2008 ; Opération « Sangaris », lancée fin 2013) (defense.gouv.fr, 2016, 2017, 2019).

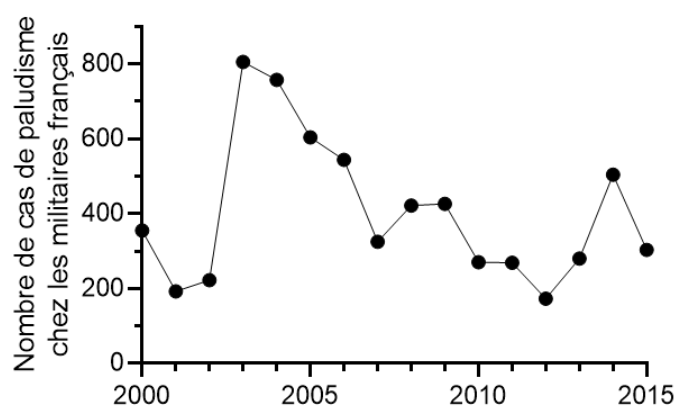


Figure 6 : Incidence du paludisme parmi les forces armées françaises (Modifié d'après Velut *et al.*, 2018).

Par les répartitions géographiques très diverses des missions, les militaires sont exposés à tous les faciès<sup>3</sup> du paludisme par exemple le faciès équatorial, tropical dans les savanes, sahélien, de moyenne altitude, désertique, urbain et de haute altitude (Carnevale et Robert, 2009).

Il est donc primordial de protéger les militaires afin de limiter l'impact opérationnel, les coûts et les contraintes logistiques liés à l'apparition de formes graves de paludisme. En effet, l'infection des militaires en opération peut saturer les moyens d'évacuation et les systèmes de santé. L'incapacité d'un seul homme sur le théâtre d'opération peut affecter le fonctionnement d'une équipe et nécessite une surveillance médicale rapprochée pour éviter l'apparition de formes graves (Sauvet *et al.*, 2009).

Le contrôle du paludisme repose principalement sur 3 stratégies au sein de l'armée française :

- la protection personnelle et la lutte anti-vectorielle (LAV) par combinaison de lutte chimique (insecticides imprégnés sur moustiquaires, sur vêtements opérationnels, ou pulvérisés sur les murs dans les bases, répulsifs sur la peau) et mécanique (drainage ou destruction des gîtes larvaires d'anophèles) pour sécuriser les alentours d'une base (Pages, 2009).
- la chimioprophylaxie
- le diagnostic et la prise en charge rapide des cas.

Ces stratégies sont complétées par la mise en place d'une surveillance épidémiologique, d'enseignements pour le personnel de santé et les militaires envoyés en mission, d'un suivi de la sensibilité des parasites du genre *Plasmodium* aux antipaludiques, et enfin, d'activités de recherche liées à la prévention, au diagnostic et au traitement du paludisme (Migliani *et al.*, 2014). Par des essais cliniques (screening et tests de nouvelles molécules thérapeutiques et prophylactiques), des évaluations de l'impact de la LAV, un suivi des marqueurs de résistances des parasites, l'armée française se positionne comme l'un des acteurs majeurs dans la protection et la lutte contre la transmission du paludisme (Fall *et al.*, 2013; Migliani *et al.*, 2014; Pradines *et al.*, 2006).

---

<sup>3</sup> Un faciès comprend les composantes écologiques et épidémiologiques de l'écosystème concerné.

## Chapitre 2 : Protection personnelle et contrôle des populations de moustiques vecteurs

### 1. Protection personnelle : les répulsifs

#### 1.1. Avant-propos

Les mesures de protection personnelle rassemblent tous les moyens prophylactiques destinés à limiter le contact entre le moustique vecteur et l'homme pour limiter l'infection par des agents pathogènes, sans tuer le vecteur directement. Différents outils peuvent être utilisés pour créer une barrière physique ou chimique protectrice.

Au niveau individuel, les outils utilisés sont principalement l'air conditionné en intérieur, les moustiquaires disposées sur les lits, le port de vêtements clairs recouvrant l'ensemble du corps qui peuvent être imprégnés d'insecticides et l'utilisation de répulsifs sur les parties exposées à l'air libre (Schoepke *et al.*, 1998; OMS, 2006). Dans certains cas, comme celui des moustiquaires imprégnées, les répulsifs et insecticides peuvent être considérés comme un outil de protection personnelle. Nous allons nous focaliser sur les molécules à effet répulsif car elles font partie intégrante de cette étude.

Un répulsif est défini comme « un produit qui engendre un comportement d'évitement de l'insecte par rapport à la source ». Les répulsifs sont des molécules biocides utilisées pour réduire les nuisances causées par les moustiques et protéger les populations de leurs piqûres (Maia *et al.*, 2018). Leurs utilisations constituent l'un des premiers réflexes lors des déplacements en pays endémique. L'avantage est une protection constante des populations humaines à la fois contre les moustiques diurnes et nocturnes, indépendamment de leur statut de résistance vis-à-vis des insecticides.

## 1.2. Mode d'action des répulsifs

Les répulsifs se différencient par leur mode d'action (Deletre *et al.*, 2016) :

- Le répulsif spatial qui induit un mouvement d'évitement sans contact avec un effet atmosphérique plus grand que la zone d'application.
- Le répulsif topique qui induit un mouvement d'éloignement par irritation après contact.
- Le répulsif inhibant qui empêche la détection des composés ou qui modifie l'odeur de l'hôte.
- Le répulsif anti-appétant qui inhibe l'activité de piqûre après contact ou ingestion, en agissant sur les récepteurs gustatifs.

Les répulsifs sont utilisés en savon, en crème, en spirale à brûler, en bougie et en spray pour la peau/les vêtements/les moustiquaires (Kelly *et al.*, 2017). Ils peuvent aussi être utilisés en imprégnation de moustiquaires pour prolonger leurs effets. Une étude a par exemple montré que le DEET pouvait empêcher les moustiques *Aedes aegypti* de se poser sur une moustiquaire et de piquer au travers durant 29 à 61 semaines dans une gamme de concentration de 4,66 à 10,5g/m<sup>2</sup>. L'IR3535 induit les mêmes effets durant 23 semaines à une concentration de 10g/m<sup>2</sup> (Faulde *et al.*, 2010).

Les principales molécules utilisées sont le DEET, l'IR3535 et le KBR3023 en plus d'autres molécules naturelles et huiles essentielles issues de plantes comme la citronnelle ou le géraniole par exemple. Grâce à son efficacité, le DEET reste le répulsif le plus utilisé depuis son développement en 1946 et sa mise sur le marché (Leal, 2014). L'IR3535 et le KBR3023 ont été développés dans les années 1970 et 1990 respectivement, ils sont aussi d'origine synthétique (**Figure 7**). Contre les *Aedes*, le DEET est le meilleur répulsif et permet une protection allant jusqu'à 10h pour les solutions contenant 20% ou plus du principe actif. Contre les *Anopheles*, les 3 répulsifs induisent une bonne protection pendant 4 à 10h (Lupi *et al.*, 2013). Les répulsifs assurent de plus en plus leur place comme des outils de choix en LAV et des études récentes visent à les rendre efficaces sur de plus longues durées grâce à des techniques d'encapsulation à libération lente (Mapossa *et al.*, 2021).

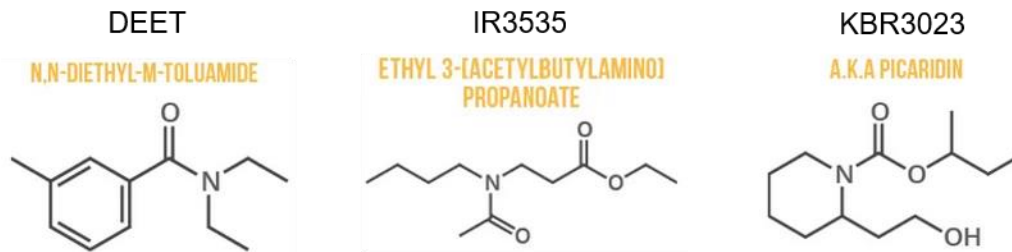


Figure 7 : Représentation des structures chimiques des principaux répulsifs chimiques utilisées en LAV.

Avant d'exposer le mode d'action complexe des répulsifs, il est bon de s'intéresser au fonctionnement du système neurosensoriel du moustique, dans la mesure où ceux-ci agissent à la fois sur le système olfactif et gustatif.

### 1.2.1. Système neurosensoriel du moustique

Les moustiques peuvent détecter des hôtes sur de grandes distances (jusqu'à 70m) (Chaisson et Hallem, 2012). Pour les aider dans ce processus, la réception des signaux sensoriels passe par les systèmes olfactif et gustatif. De nombreux croisements de fonctions existent entre ces deux systèmes, si bien qu'ils sont souvent sollicités simultanément au niveau anatomique et moléculaire pour l'évaluation des stimuli extérieurs (Melo *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2006; Riabinina *et al.*, 2016).

#### 1.2.1.1. Système olfactif du moustique

Le système olfactif du moustique lui permet de détecter une grande gamme de molécules odorantes. Cependant, contrairement aux systèmes visuels et auditifs dont les stimuli sont caractérisés respectivement par la longueur d'onde ou la fréquence, la discrimination des stimuli olfactifs dépend de nombreux paramètres. En effet, l'olfaction nécessite l'expression de nombreux récepteurs dits olfactifs qui permettront de différencier les stimuli par un codage issu de la combinaison de la stimulation (ou non) de ces récepteurs. C'est donc un système très complexe impliqué notamment dans la détection de l'hôte, l'attraction, la répulsion, l'évitement de la dessiccation, la détection du sexe des individus de la même espèce ou encore le repérage de nourriture ou d'un site de ponte chez le moustique (Lu *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2009). Pour repérer un hôte, *An. gambiae* utilise par exemple le CO<sub>2</sub> en combinaison avec des molécules odorantes émises par la peau comme l'ammoniaque et l'acide lactique. Cependant, la réponse

comportementale à ces molécules odorantes est très dépendante de leur concentration et de leur ratio (Smallegange *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2011; Chaisson et Hallem, 2012).

### Les sensilles et neurones récepteurs olfactifs

Les moustiques détectent les odeurs grâce aux neurones récepteurs olfactifs (NROs) situés dans les sensilles portées par les antennes, les palpes maxillaires et le proboscis (Paluch *et al.*, 2010; Riabinina *et al.*, 2016; Schmidt et Benton, 2020). Les sensilles sont de petites soies poreuses, nombreuses et complexes dans les antennes, utilisées pour détecter les odeurs mais aussi les goûts (Pitts *et al.*, 2004). Il existe différents types de sensilles (e.g. basiconique, trichoïde et coeloconique) qui se différencient par leur taille, les combinaisons de NROs qu'elles contiennent ainsi que le nombre de pores (**Figure 8, encadré blanc**) (Keil, 1997). Les pores permettent aux molécules odorantes de pénétrer dans la sensille. Une fois solubilisées dans la lymphe sensillaire, elles sont transportées par les protéines olfactives de transport (OBP) sécrétées par les cellules thécogène, trichogène et tormogène jusqu'à la dendrite unique des NROs qui se projette dans la sensille (**Figure 8**) (Schmidt et Benton, 2020). Les NROs possèdent aussi un axone qui se projette dans le lobe antennaire, centre d'intégration olfactif (Riabinina *et al.*, 2016).

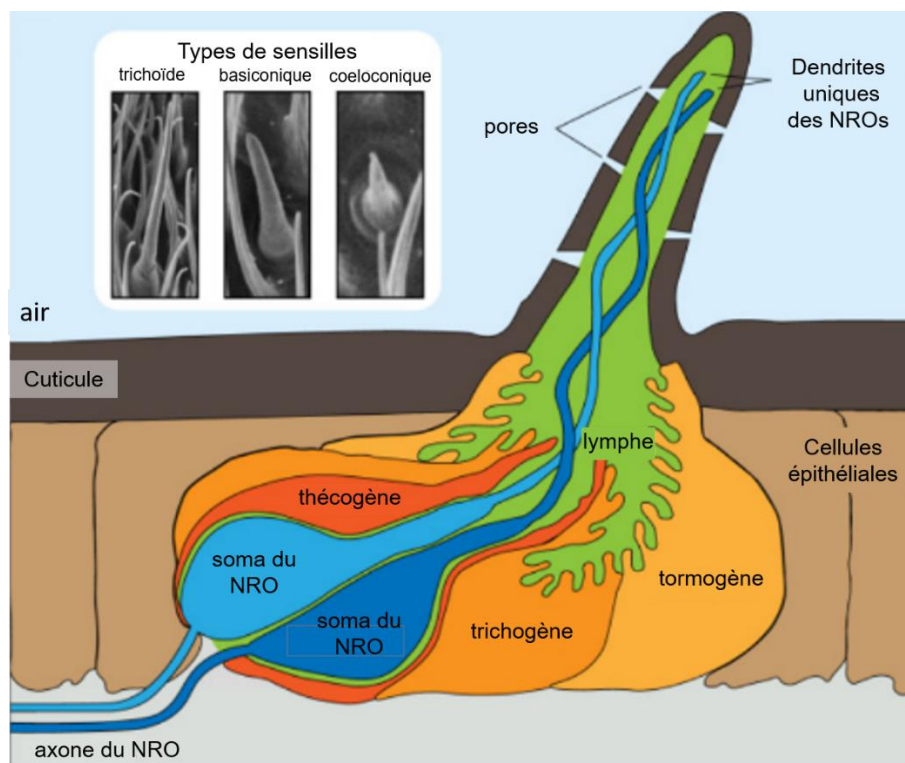


Figure 8 : Schéma d'une sensille contenant des neurones récepteurs olfactifs (NROs) (Modifié d'après Schmidt et Benton, 2020).



### Les récepteurs olfactifs

Le complexe OBP-molécule odorante active les récepteurs olfactifs (RO) membranaires exprimés à la surface de la dendrite des NROs. Au niveau moléculaire, 79 gènes de récepteurs olfactifs ont été identifiés chez *An. gambiae* (Hill *et al.*, 2002). Les ROs sont des récepteurs-canaux hétéromériques perméables aux cations composés d'une sous-unité ROx qui détecte l'odeur et d'un co-récepteur Orco (Sato *et al.*, 2008). Les NROs expriment aussi des récepteurs ionotropiques (RI) apparentés à des récepteurs glutamatergiques associés au co-récepteur IR8a ou IR25a (Schmidt et Benton, 2020). Chaque NRO exprime au moins 2 RO ou IR différents, capables de lier spécifiquement différents ligands. Par exemple, une odeur active certains ROs mais pas d'autres, comme OR8 répond à l'octénol mais pas OR2 et OR10 (Dickens et Bohbot, 2013).

De l'activation des ROs et RIs résulte une dépolarisation membranaire conduisant à l'ouverture de canaux ioniques dépendants du potentiel et à la genèse de potentiels d'action qui se propagent le long de l'axone. Dans le lobe antennaire, le message olfactif codé par les potentiels d'actions est intégré par les neurones centraux dans les glomérules. La combinaison des glomérules activés ou non permet la discrimination de l'odeur par l'insecte (Ghaninia *et al.*, 2007). Une fois transmis aux corps pédonculés, centre de l'apprentissage olfactif, le message olfactif est perçu et interprété.

#### 1.2.1.2. Système gustatif du moustique

Pour les moustiques, le système gustatif est essentiel afin de se nourrir, se reproduire, de piquer et d'évaluer la qualité d'un site de ponte potentiel. Ils ont donc développé des organes complexes au niveau des pièces buccales et des pattes, ainsi qu'un organe interne dédié (**Figure 9**) (Baik et Carlson, 2020).

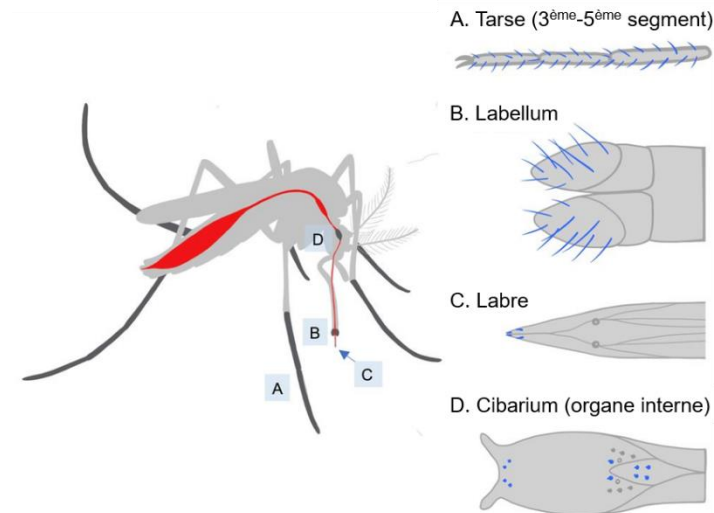


Figure 9 : Anatomie des organes impliqués dans la gustation chez le moustique (Modifié d'après Baik et Carlson, 2020).

### Les sensilles et neurones récepteurs gustatifs

A la manière du système olfactif, les organes gustatifs sont couverts de soies sensorielles, appelées sensilles, de morphologies différentes. Les sensilles trichoïdes sortent à la surface du tarse et du labellum, ne possèdent qu'un pore situé à l'extrémité (**Figure 10A**) tandis que les autres sensilles, appelées apicales et subapicales, sont orientées contre la surface du labre (**Figure 10B**). Le dernier type de sensille, appelé papille, est situé dans l'organe interne cibarium (**Figure 10C**). Chacune de ces sensilles contient un petit nombre de neurones récepteurs gustatifs (NRG), généralement entre 3 et 5, et des cellules de soutien qui vont sécréter des protéines capables de transporter les composés gustatifs jusqu'aux NRG (Baik et Carlson, 2020).

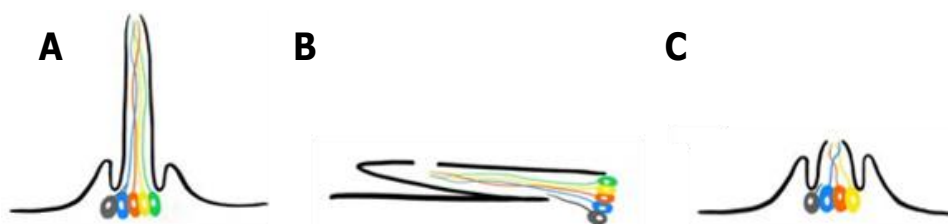


Figure 10 : Morphologie des sensilles gustatives. A) Sensille trichoïde, B) apicale/subapicale, C) papille. En couleur sont représentés des neurones récepteurs gustatifs (Modifié d'après Baik et Carlson, 2020).

Le corps cellulaire des NRGs projette des dendrites vers le pore de la sensille à travers lequel passent les composés gustatifs. Les NRGs projettent un axone vers les lobes antennaires comme les NROs (Sparks *et al.*, 2018). La réponse des NRGs à ces composés est mesurable par des expériences d'électrophysiologie en courant imposé pour enregistrer la variation de fréquence de décharge des potentiels d'action. Il a été montré chez *An. gambiae* que ces NRGs réagissent

aux composés sucrés, amers, aux sels et acides aminés (Kessler *et al.*, 2013; Kessler *et al.*, 2015; Sparks et Dickens, 2016).

### **Les récepteurs gustatifs**

Les moustiques expriment une grande diversité de récepteurs gustatifs (GR) sur les NRGs. Chez *An. gambiae*, 76 gènes codent ces récepteurs couplés à des protéines G (Hill *et al.*, 2002). D'autres récepteurs candidats pourraient être impliqués dans la gustation, comme les transient receptor potential (TRPs), les récepteurs PickPocket (Ppk) et d'autres récepteurs ionotropes (Baik et Carlson, 2020). Certains GR sont exprimés dans le tarse mais pas dans le labellum et inversement, suggérant des rôles individuels dans les organes sensoriels du goût.

## **1.2.2. Effets classiques des répulsifs chez l'insecte**

Les répulsifs synthétiques et naturels (e.g. huiles essentielles ou extraits de plantes) agissent sur le système olfactif et gustatif des insectes. Malgré leur succès commercial, le mode d'action des répulsifs reste peu compris. Comme il est encore actuellement le gold standard, le mode d'action du DEET est le plus décrit, majoritairement sur *A. aegypti*. Il servira donc d'exemple principal pour décrire ce qui est connu aujourd'hui sur la complexité du mode d'action des répulsifs.

### **Action sur les récepteurs olfactifs**

Des expériences d'électroantennographie sur *A. aegypti* ont prouvé que le DEET agit sur des RO spécifiques induisant l'effet répulsif strict par lui-même, sans interaction avec d'autres composés (Stanczyk *et al.*, 2013). La présence de tels récepteurs olfactifs (ROx) a été montrée chez plusieurs espèces de moustiques (Syed et Leal, 2008; Stanczyk *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014) et est vérifiée même chez la larve d'*An. gambiae* où le DEET induirait un effet répulsif (Xia *et al.*, 2008). Le DEET agirait notamment sur le co-récepteur olfactif Orco puisque les *A. aegypti* mutés expérimentalement sur ce récepteur présentent des réponses bien plus faibles aux odeurs au niveau neuronal (Degennaro *et al.*, 2013). Cependant, chez *An. gambiae*, le complexe ORx/Orco n'est pas inhibé par le DEET alors qu'il l'est par d'autres répulsifs (Tsitoura *et al.*, 2015). Il a été montré que, en l'absence d'odeur (indole et octénol), le DEET est capable de stimuler le récepteur AaOR2 mais pas AaOR8 exprimé en système hétérologue dans l'ovocyte de xénope, mais, en présence d'odeur, il stimule AaOR8 et pas AaOR2 (Bohbot et Dickens, 2010; Dickens et Bohbot, 2013).

L'action des répulsifs sur leurs cibles, qu'elle soit agoniste, antagoniste ou modulatrice, est donc très variable et dépend du récepteur olfactif et du répulsif considéré (Bohbot et Dickens, 2010; Sinka *et al.*, 2010; Dickens et Bohbot, 2013).

### **Séquestration des composés attractifs**

Le DEET pourrait aussi se lier aux composés attractifs sur leur source, les empêchant d'être émis et donc détectés par le moustique. Une diminution de l'émanation de l'octénol a, par exemple, été observé lorsqu'il est co-appliqué sur un papier buvard avec le DEET (Syed et Leal, 2008). Cela a cependant été fortement controversé par une autre étude indiquant l'absence d'interaction DEET-octénol (Pellegrino *et al.*, 2011).

### **Inhibition de la détection des composés attractifs**

Des études ont montré que le DEET était capable d'inhiber la genèse des potentiels d'action dans les neurones olfactifs situés dans les antennes d'*A. aegypti* normalement induit par l'acide lactique, un composant de la sueur humaine, ou l'éthyl propionate, un attractant pour la ponte (Davis et Sokolove, 1976; Kuthiala *et al.*, 1992). Cela est confirmé sur *An. gambiae* et *D. melanogaster* chez qui le DEET inhibe la réponse électrophysiologique des neurones répondant habituellement aux odeurs attractives (Ditzen *et al.*, 2008). L'inhibition de la réponse aux attractants des neurones olfactifs par le DEET pourrait s'expliquer par une structure similaire. Ce dernier se fixerait sur les récepteurs impliqués dans la réponse aux attractants (Bohbot et Dickens, 2010b). Cependant, les moustiques génétiquement sélectionnés pour être moins sensibles au DEET répondent toujours normalement à l'octénol (Stanczyk *et al.*, 2010).

### **Action sur les récepteurs gustatifs**

Même si la plupart des études sur l'effet des répulsifs concernent leur capacité à stimuler des NROs, l'effet du DEET sur le système gustatif n'est pas à négliger.

Les NRGs activés par le DEET seraient impliqués dans la répulsion au contact par le goût mais aussi dans l'effet anti-appétant. En effet, des NRGs situés dans la sensille du labellum d'*A. aegypti* peuvent le détecter. L'IR3535 serait aussi capable de stimuler certains NRGs chez *A. aegypti* (Sanford *et al.*, 2013). De la même manière, l'effet anti-appétant du DEET est médié en partie par des NRGs chez *Drosophila melanogaster* et nécessite l'activation combinée de plusieurs GR (Lee *et al.*, 2010). Chez les anophèles, l'effet anti-appétant du DEET est probablement dû à une activation des neurones sensibles au goût amer et à une inhibition des neurones sensibles au goût sucré (Sparks et Dickens, 2016).

### 1.2.3. Effets atypiques des répulsifs chez les insectes

En plus d'un mode d'action relativement complexe au niveau répulsion stricte, les répulsifs présentent aussi des effets atypiques et inattendus car ils sont capables d'induire des effets sur des systèmes physiologiques non sensoriels. Certains répulsifs, notamment le DEET et le KBR3023, ont démontré un effet knock-down et de la mortalité retardée sur plusieurs espèces de moustiques (Xue *et al.*, 2003; Pannetier *et al.*, 2007; Corbel *et al.*, 2009; Pridgeon *et al.*, 2009). Le DEET a aussi montré de la toxicité chez *Rhodnius prolixus*, un hyménoptère, contrairement à l'IR3535 (Alzogaray, 2016). Parmi les mécanismes physiologiques régulés par les répulsifs chez l'insecte qui sont détaillés dans la partie qui suit, on compte notamment : une altération de l'activité locomotrice chez l'insecte, de la neuroexcitation et neurotoxicité passant par le système octopaminergique, des altérations du système cholinergique par inhibition de l'acétylcholinestérase et interaction avec les récepteurs cholinergiques de type muscariniques, la régulation de l'activité d'enzyme de détoxification (Legeay *et al.*, 2018). Les répulsifs sont aussi capables de potentialiser l'effet des insecticides (Abd-Ella *et al.*, 2015; El-Adouzi *et al.*, 2020; Moreau *et al.*, 2020)

#### Effet des répulsifs sur l'activité locomotrice des insectes

La toxicité du DEET a été étudiée chez la blatte *B. germanica*. Une pré-exposition de 20 à 30 minutes à 700µg/cm<sup>3</sup> de DEET induit une réduction significative de l'activité locomotrice de l'insecte. La réduction d'activité est cependant réversible en 24h. Dans ce cas, le DEET conserve son action répulsive, ce qui suggère que le mode d'action est différent sur l'activité locomotrice et la répulsion. L'altération de la locomotion sollicite la voie de signalisation NO/cGMP qui est aussi recrutée dans le phénomène d'adaptation à une exposition prolongée au DEET (Sfara *et al.*, 2013; Sfara *et al.*, 2016). Cette réduction d'activité locomotrice pourrait être attribuée à l'effet neurotoxique du DEET sur le système nerveux central de l'insecte (Alzogaray, 2016; Legeay *et al.*, 2018).

#### Effet sur l'acétylcholinestérase

Le DEET est capable d'induire des modifications de la transmission synaptique par une inhibition réversible de l'activité anticholinestérasique sur des préparations neuronales d'insectes (blatte *Periplaneta americana*) et de souris à la manière du propoxur, un insecticide CX (Corbel *et al.*, 2009). Le rôle de l'acétylcholinestérase sera détaillé plus loin dans ce manuscrit (**cf. Introduction, chapitre 2, partie 2.2.1.**). Le répulsif inhibe l'enzyme en se fixant principalement sur le site périphérique situé dans la gorge active.

### **Effet sur les récepteurs octopaminergiques**

Le DEET peut aussi induire de la mortalité en application topique à des doses de l'ordre du ng/mg d'insecte sur les moustiques *An. gambiae*, *A. aegypti* et sur la mouche *M. domestica*. Cette toxicité est reliée au niveau cellulaire, à sa capacité d'activer de manière dose-dépendante les récepteurs octopaminergiques exprimés dans des cellules Sf21 pour induire de la neuroexcitation et de la neurotoxicité (Swale *et al.*, 2014).

### **Effet sur les récepteurs muscariniques**

Cette particularité des répulsifs sera exploitée dans ce travail de thèse et fera donc l'objet d'une partie dédiée dans cette introduction (**cf. Introduction, chapitre 4, partie 2.3.**).

### **Effet sur les traits d'histoire de vie**

L'équipe de Cohuet et collaborateurs a montré qu'une première exposition de femelles *An. gambiae* au DEET induit une diminution du taux de gorgement et une diminution du nombre d'œufs pondus et viables jusqu'à l'âge adulte (Mulatier *et al.*, 2018). Le DEET a donc un impact sur le comportement et les traits d'histoire de vie du moustique. L'inhibition de gorgement causée par le DEET est d'ailleurs renforcée avec l'âge chez *An. gambiae* et *A. albopictus*. Cela suggère que le ciblage des moustiques âgés est possible avec les répulsifs (Mulatier *et al.*, 2018). Les moustiques âgés sont des cibles importantes des programmes de contrôle des populations de vecteurs dans la mesure où ce sont les plus susceptibles d'avoir passé la période d'incubation extrinsèque du parasite et donc d'être infectieux.

## **2. Contrôle des populations de vecteurs : les insecticides**

### **2.1. Avant-propos**

Le contrôle des populations de vecteurs d'agents pathogènes est un élément clé dans la prévention de la transmission du paludisme. L'objectif de la LAV est la diminution du nombre de moustiques infectants. En plus de la lutte biologique (Kamareddine, 2012; Derua *et al.*, 2019), génétique (Lees *et al.*, 2015; Hammond *et al.*, 2016; Nolan, 2021) et mécanique (CNEV, 2016), cet objectif repose principalement sur la lutte chimique et donc sur l'utilisation de molécules à effet insecticide dont ce chapitre fait l'objet.

## 2.2. La lutte chimique

En LAV, les insecticides sont utilisés de plusieurs manières :

- Directement dans les gîtes larvaires.
- En pulvérisation intra-domiciliaire rémanente (« indoor residual spraying », IRS)
- En pulvérisation spatiale non rémanente pendant les épidémies.
- En imprégnation de moustiquaires « insecticide-treated nets » (ITNs) dont la durée de vie effective est de 6 à 12 mois entre chaque ré-imprégnation, ou, plus récemment, les moustiquaires à longue durée d'efficacité (« long-lasting insecticide-treated nets (LLINs)), où l'insecticide est accroché chimiquement ou incorporé dans les fibres, et est libéré graduellement. L'efficacité doit être d'au moins trois ans et résister à 20 lavages pour que la moustiquaire bénéficie d'une recommandation de l'OMS. Seuls les pyréthrinoïdes sont utilisés en imprégnation de moustiquaires à cause de leur rapidité d'action, de leur effet excito-répulsif pour les insectes et de leur faible toxicité pour les humains.

A ce jour, 4 sous-groupes chimiques d'insecticides, indiqués entre parenthèse ci-dessous, sont principalement utilisés pour lutter contre la transmission du paludisme (IRAC, 2015) :

- les inhibiteurs de l'AcE (carbamates (groupe 1A) ; organophosphorés (groupe 1B))
- les modulateurs des canaux sodium (pyréthrinoïdes (groupe 3A) ; le DDT (groupe 3B)).

Les organochlorés ont été abandonnés à cause de leur toxicité pour l'homme et la faune non-cible ainsi que leur rémanence dans l'environnement.

A la suite des rapports d'expertise collective de l'Anses de 2013 et 2016, plusieurs molécules ont été jugées comme particulièrement intéressantes pour l'utilisation en LAV au vu de leur profil écotoxicologique (**Tableau 2**).

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

Tableau 2 : Classement des 32 substances actives utilisables en LAV. Classe A : substances dont l'efficacité sur moustiques est connue et sont ou ont été utilisées en LAV ; Classe B : substances dont l'efficacité sur moustiques est connue à titre expérimental mais qui n'ont pas été utilisées en LAV ; Classe C : substances dont l'efficacité est connue sur d'autres espèces de diptères mais qui reste à déterminer sur moustiques (Rapport d'expertise collective de l'Anses, 2013). A noter, la plupart de ces molécules ont été testées sur moustique depuis 2013.

Ces rapports soulignaient la nécessité d'élargir le panel de produits destinés à lutter contre les moustiques basés sur des molécules dont l'efficacité de certaines est suspectée ou a déjà été prouvée sur moustique. Au vu des rapports de l'IRAC et de l'Anses, il est important de noter qu'un intérêt grandissant est porté sur les insecticides néonicotinoïdes (4A) et mésoioniques (4E) qui ciblent les récepteurs cholinergiques de type nicotinique (**cf. Introduction, chapitre 2, partie 2.2.3.**).

Tous ces insecticides agissent sur différentes cibles au niveau neuronal pour perturber la transmission de l'influx nerveux (**Figure 11**) (Field *et al.*, 2017).



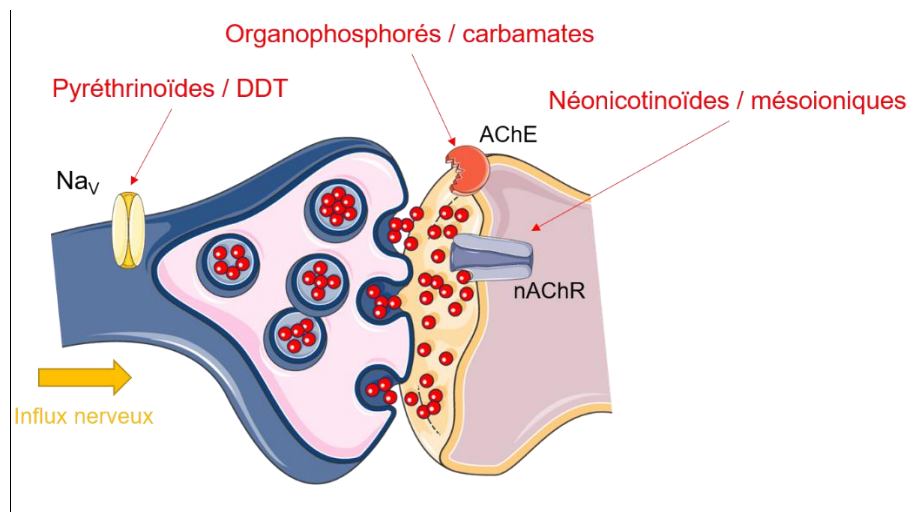


Figure 11 : Représentation schématique des cibles des différentes classes d'insecticides dans une synapse d'insecte.  $Na_v$  : canal sodium dépendant du potentiel ; AChE : acétylcholinestérase ; nAChR : récepteur cholinergique de type nicotinique (Modifié d'après Field *et al.*, 2017).

### 2.2.1. Les insecticides ciblant l'acétylcholinestrase

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme codée par le gène *ace-1* qui hydrolyse l'acétylcholine, le neurotransmetteur exciteur le plus abondant dans le système nerveux central des insectes. L'influx nerveux présynaptique permet la fusion à la membrane de vésicules contenant les neurotransmetteurs, qui libère l'ACh, qui va se fixer sur les récepteurs nicotiques au niveau postsynaptique. L'action catalytique très rapide de l'AChE au niveau synaptique permet de limiter l'effet de l'ACh dans le temps (Weill *et al.*, 2003). Dans les conditions normales, l'acétylation de la sérine 200 ( $Ser^{200}$ ) du site actif de l'AChE par la liaison avec l'ACh permet l'hydrolyse de cette dernière et la libération du site en quelques millisecondes (**Figure 12A**). L'AChE possède un site actif étroit en forme de gorge dont le site catalytique, appelé site estérasique, est situé au fond de la gorge qui sert aux fonctions catalytiques. Juste au-dessus de la  $Ser^{200}$ , à l'entrée de la poche, se trouve le pore électrophile oxyanionique autrement appelé site périphérique ou site anionique (Radi et Taylor, 2006; Dvir *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2012). Ce dernier sert à la fixation du substrat en captant l'oxygène carbonyle de l'ACh et l'oxygène phosphorylé des OPs par exemple. Il existe aussi un gène *ace-2* qui code l'AChE2 mais dont le rôle physiologique n'est pas connu et qui n'est pas une cible des insecticides (Weill *et al.*, 2003).

## Organophosphorés

Les OP comme le malathion ou le téméphos sont des insecticides dérivés de l'acide phosphorique qui ont petit à petit remplacé les organochlorés quelques années après la Seconde Guerre Mondiale (Xie *et al.*, 1986). Ce sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE). Lorsqu'un OP se lie à l'AChE et phosphoryle la Ser<sup>200</sup>, le temps de liaison dure plusieurs heures, voire plusieurs jours, temps pendant lequel l'enzyme est inactive (**Figure 12B**) (Casida et Durkin, 2013). L'inhibition de l'AChE induit une accumulation d'ACh dans la fente synaptique, causant une hyperexcitation du neurone postsynaptique. L'accumulation d'ACh entraîne aussi une rétro-inhibition de la sécrétion d'ACh en agissant sur les récepteurs muscariniques de type M2 au niveau présynaptique (Corbel *et al.*, 2006). L'insecticide induit donc une paralysie puis la mort de l'insecte.

## Carbamates

Les carbamates (CX) comme le propoxur sont des dérivés synthétiques de l'ésérine. A la manière des OP, avec lesquels ils partagent leur mode d'action, ils ont été largement commercialisés plusieurs années après la Seconde Guerre Mondiale. L'inhibition de l'AChE passe cette fois par la carbamoylation de la Ser<sup>200</sup> du site actif, causant une liaison longue de 15 à 20 minutes (**Figure 12C**) (Casida et Durkin, 2013).

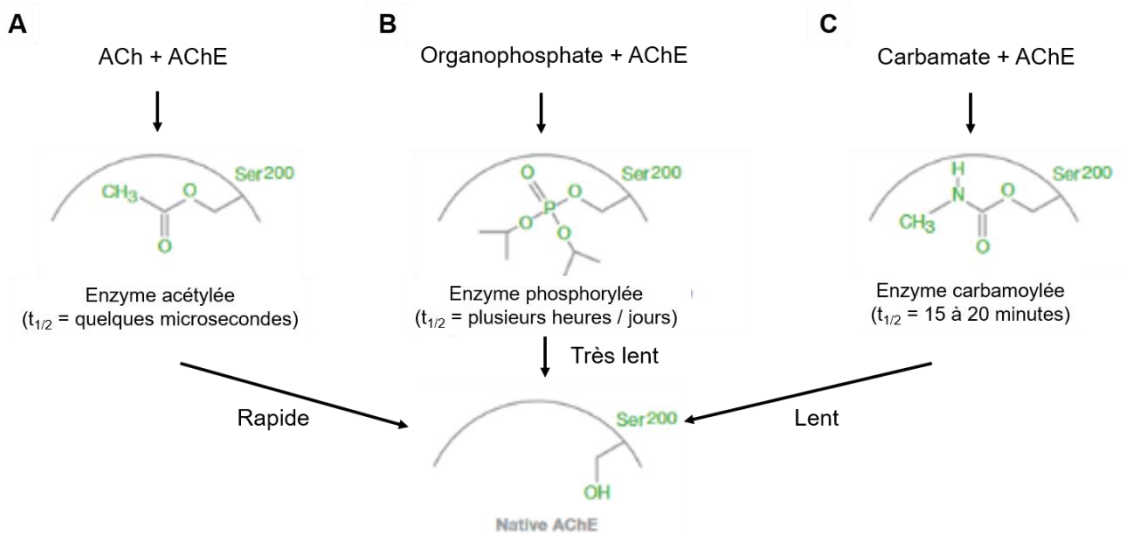


Figure 12 : Mode d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. A) Acétylation de la Ser<sup>200</sup> en condition normale, B) Phosphorylation de la Ser<sup>200</sup> par un organophosphoré, C) Carbamoylation de la Ser<sup>200</sup> par un carbamate (Modifié d'après le Manuel Technique de BASF Agro, 2013).

Les insecticides ciblant l'ACHé présentent une certaine toxicité pour les mammifères, il est donc nécessaire d'augmenter la spécificité des inhibiteurs de l'ACHé (Casida et Quistad, 2004). Réussir à synthétiser des inhibiteurs 100 fois plus spécifiques de l'ACHé de moustique par rapport à l'ACHé humaine serait encourageant. Il s'agirait alors de cibler un résidu cystéine (C286) présent sur l'ACHé d'insecte mais absent sur l'ACHé humaine (Pang, 2006; Carlier *et al.*, 2017).

### 2.2.2. Les insecticides ciblant les canaux sodiques dépendants du potentiel

Les canaux sodium dépendants du potentiel ( $Na_v$ ) d'insectes sont des protéines transmembranaires impliquées dans la phase de dépolarisation du potentiel d'action (PA), et donc dans la genèse et la propagation de celui-ci le long de l'axone des cellules nerveuses. Ils sont composés d'une sous-unité *para* assimilable à une sous-unité  $\alpha$  de mammifère et associée à une sous-unité auxiliaire *TipE* ou un homologue TEH1A ou TEH1B assimilable à une sous-unité  $\beta$  de mammifère (Moignot *et al.*, 2009; Bourdin *et al.*, 2013; Dong *et al.*, 2014; Bourdin *et al.*, 2015). La sous-unité *para* constitue le pore du canal, elle est impliquée dans la détection du potentiel, la dépendance vis-à-vis du potentiel, la perméabilité/sélectivité ionique et dans l'inactivation du canal. La sous-unité auxiliaire régule les propriétés électrophysiologiques et fonctionnelles du canal ainsi que la sensibilité à certains insecticides (Bourdin *et al.*, 2013). Elle permet aussi une meilleure expression et une augmentation de l'amplitude du courant des  $Na_v$  exprimés en système hétérologue (Feng *et al.*, 1995).

En réponse à une dépolarisation membranaire, la porte d'activation du canal s'ouvre et permet le passage d'ions sodium dans la cellule. Le courant ainsi généré est ensuite inactivé en quelques millisecondes par la fermeture de la porte d'inactivation. L'inactivation du courant sodique est donc impliquée dans la phase de repolarisation du PA avec l'ouverture des canaux potassiques dépendants du potentiel. Après la stimulation, le canal est en période réfractaire durant laquelle il est fermé et inactivé par la fermeture simultanée de la porte d'activation et d'inactivation. La désactivation est l'étape pendant laquelle le canal retourne à l'état activable. Après la réouverture de la porte d'inactivation (réactivation), seule la porte d'activation est fermée et le canal est donc à l'état fermé (**Figure 13**) (Dong *et al.*, 2014; Hernandez et Richards, 2019). Grâce à des expériences d'électrophysiologie, il est possible d'étudier la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation et de l'inactivation des canaux ioniques. La superposition des

courbes d'activation et d'inactivation permet de déterminer le courant de fenêtre qui traduit la probabilité que les canaux soient ouverts à l'état stable (Frenz *et al.*, 2014).

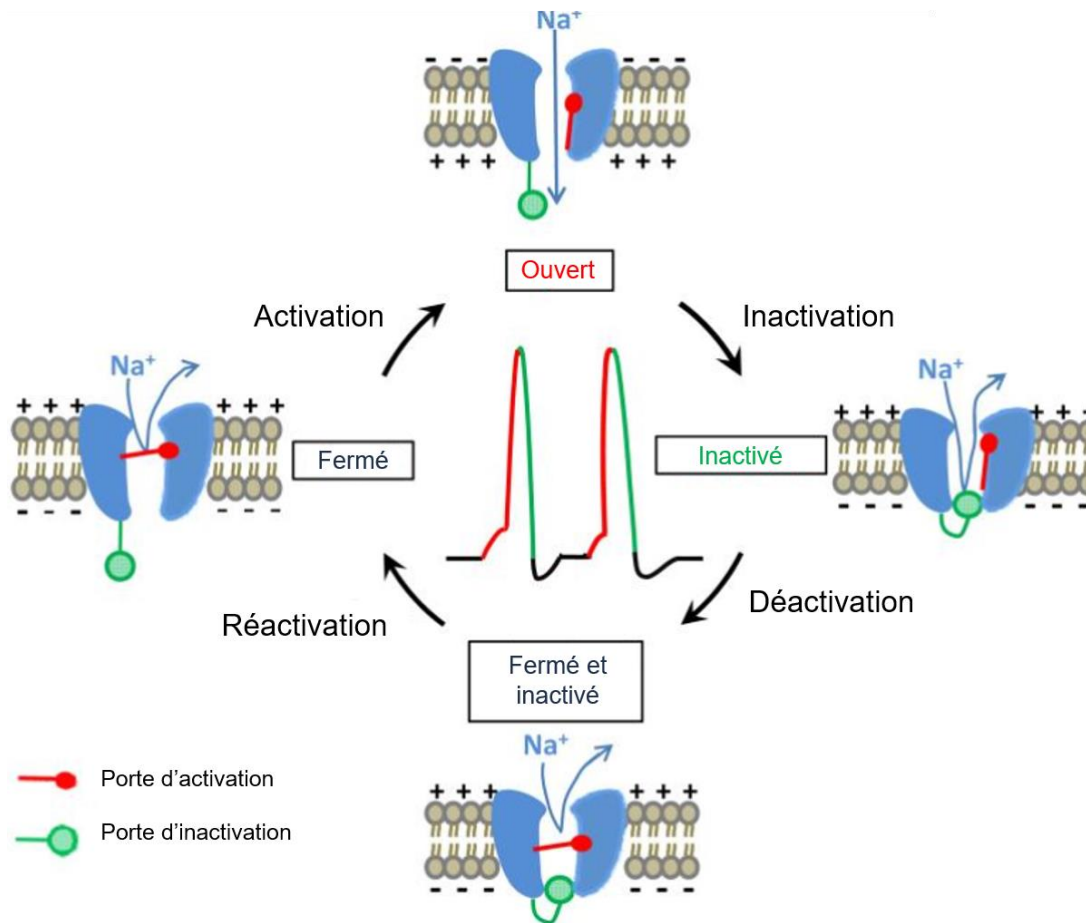


Figure 13 : Variables d'activation et d'inactivation du canal sodium dépendant du potentiel (Modifié d'après Dong *et al.*, 2014).

La structure de la sous-unité  $\alpha$ /*para* du canal sodium est constituée de 4 domaines transmembranaires numérotés de I à IV. Chaque domaine contient 6 segments numérotés de S1 à S6 reliés par des boucles extra- et intra-cellulaires (**Figure 14**). Le segment S4 de chaque domaine correspond au détecteur de potentiel. Chaque segment S4 contient 5 à 8 résidus positifs, arginine ou lysine, séparés par 2 acides aminés neutres. Ces résidus chargés positivement permettent aux segments S4 de changer la conformation du canal lors d'une variation de potentiel membranaire. Les segments S1 à S4 constituent le domaine sensible au potentiel. Les segments S5 et S6 forment le pore du canal (Wicher *et al.*, 2001; Dong, 2007; Moignot *et al.*, 2009). La sélectivité ionique du canal est déterminée par les acides aminés D,E,K,A (acide aspartique, acide glutamique, lysine, alanine, respectivement) situés en positions analogues dans les boucles P entre les segments S5 et S6. L'inactivation rapide est quant à elle médiée par le mouvement de la porte d'inactivation formée principalement des résidus I,F, M et T (isoleucine, phénylalanine,

méthionine, thréonine, respectivement) situés dans la boucle DIIIS6-DIVS1 (Dong *et al.*, 2014). De par leurs fonctions essentielles dans la genèse de l'influx nerveux, les canaux  $Na_v$  sont la cible de nombreuses molécules comme les insecticides de type pyréthrinoïdes (Field *et al.*, 2017).

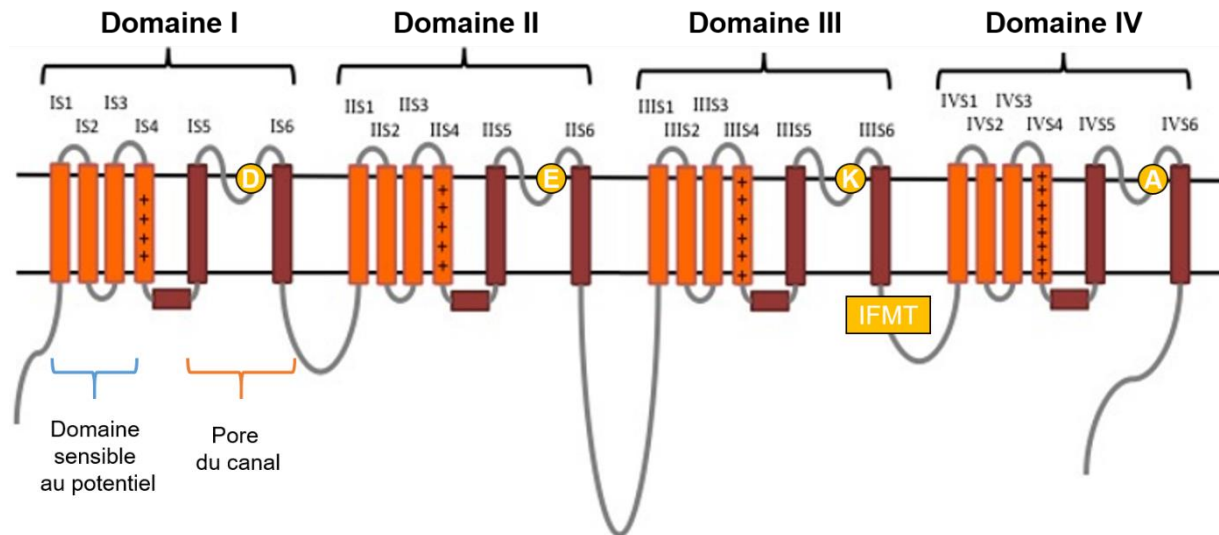


Figure 14 : Représentation schématique de la structure de la sous-unité  $\alpha$  du canal sodium dépendant du potentiel d'insecte (Modifié d'après Dong *et al.*, 2014).

## Les pyréthrinoïdes

Les pyréthrinoïdes sont des molécules de synthèse dérivées des pyréthrines, insecticides naturels provenant des fleurs de chrysanthème, *Tanacetum cinerariifolium*. Majoritairement recommandés par l'OMS en LAV grâce à leurs fortes propriétés excito-répulsives et leur faible toxicité pour les mammifères, ils ont été synthétisés dans les années 1970 pour pallier le problème de photosensibilité des pyréthrines (Elliott *et al.*, 1973). Ils sont classés en deux groupes selon la présence ou non d'une liaison  $\alpha$ -cyanée dans leur structure chimique, absente chez les pyréthrinoïdes de type I comme la perméthrine mais présente chez les pyréthrinoïdes de type II comme la deltaméthrine (Casida et Durkin, 2013). Les pyréthrinoïdes de type II possèdent une meilleure affinité pour le canal sodium et leur utilisation nécessite donc des doses plus faibles pour arriver à un niveau de contrôle équivalent. Bien que ces molécules possèdent aussi des propriétés répulsives, elles sont principalement utilisées pour leurs propriétés insecticides (Kawada *et al.*, 2014).

Ces insecticides altèrent les transitions rapides d'états conformationnels entre l'état ouvert et l'état fermé ou inactivé en se fixant sur la sous-unité *para*. Les pyréthrinoïdes de type I agissent sur l'état fermé du canal, au repos, et augmentent la durée d'ouverture des canaux

$Na_v$ , générant une queue de courant entrant de désactivation ralentie et une augmentation de la fréquence de décharge des potentiels d'action (PAs). Les pyréthriinoïdes de type II ont une plus haute affinité pour l'état ouvert du canal. Ils agissent de la même manière que le type I mais induisent une queue de courant de désactivation plus importante causant une dépolarisation constante de la membrane du neurone qui aboutit à une suppression des PAs (**Figure 15**) (Shafer *et al.*, 2005; Soderlund, 2008, Soderlund, 2012; Casida et Durkin, 2013; Field *et al.*, 2017).

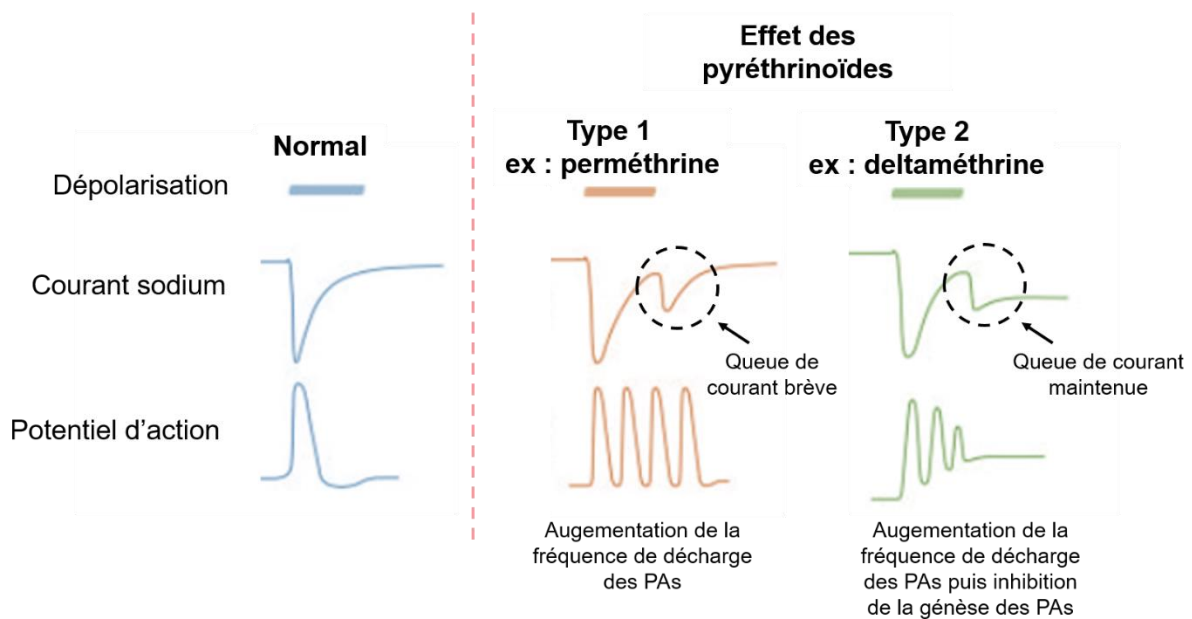


Figure 15 : Mode d'action des pyréthriinoïdes de type I et II (Modifié d'après Shafer *et al.*, 2005).

### 2.2.3. Les insecticides ciblant les récepteurs cholinergiques de type nicotinique

Les récepteurs à l'acétylcholine de type nicotinique (nAChRs) sont des glycoprotéines impliquées dans la transmission synaptique rapide de l'information nerveuse. Chez l'insecte, ces récepteurs sont confinés au niveau du système nerveux central où leur densité est très forte, comparable à celle retrouvée dans les organes électriques de l'anguille *Electrophorus electricus* (Ihara *et al.*, 2017; Casida, 2018; Matsuda *et al.*, 2020). L'arrivée des potentiels d'action au niveau du bouton synaptique du neurone présynaptique induit l'exocytose de vésicules d'ACh qui va se fixer sur les nAChRs du neurone postsynaptique (**Figure 16A**). La membrane postsynaptique est alors dépolarisée. Dans la fente synaptique, l'ACh est ensuite dégradée par l'acétylcholinestérase évoquée plus tôt.

Les nAChRs sont des récepteurs-canaux transmembranaires perméables au sodium, au potassium et/ou au calcium faisant partie de la superfamille des récepteurs Cys-loop (Jones *et al.*, 2021). Chaque sous-type de nAChRs est constitué de 5 sous-unités organisées en rosette (Dani, 2015). Chaque sous-unité comprend 4 domaines transmembranaires nommés de M1 à M4. Le domaine M2 est orienté vers l'intérieur du canal et forme le pore de celui-ci. Le nAChR peut être homo- ou hétéro-pentamérique et sélectif d'un ou plusieurs ions selon la stœchiométrie du récepteur. Chez l'insecte, la majorité des récepteurs serait des hétéropentamères mais les sous-unités  $\alpha 7$  et  $\alpha 9$  peuvent faire des récepteurs homomériques (Matsuda *et al.*, 2020; Jones *et al.*, 2021). Le site de fixation de l'ACh se situe à l'interface entre une sous-unité  $\alpha$  et une autre sous-unité (**Figure 16B**). La sous-unité  $\alpha$  possède deux résidus cystéines très importants pour fixer l'ACh que les autres sous-unités dites non-alpha ne possèdent pas. Ce site de fixation implique 6 boucles d'acides aminés (nommées A, B, C, D, E, F) situées à l'interface des deux sous-unités (3 boucles par chaque sous-unité) mettant en jeu des résidus spécifiques pour la fixation du neurotransmetteur (**Figure 16C**) (Matsuda *et al.*, 2001). *An. gambiae* exprime 9 gènes codant des sous-unités  $\alpha$ , nommées  $\alpha 1$  à  $\alpha 9$ , et un gène codant la sous-unité  $\beta 1$  (Jones *et al.*, 2005). L'assemblage de ces sous-unités donne une grande diversité de sous-types de nAChRs, qui sont différents d'un type cellulaire à un autre (Jones et Sattelle, 2010). Malheureusement, les sous-types de nAChRs exprimés à la surface du neurone de moustique sont mal connus malgré la publication du génome d'*An. gambiae* (Holt *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2005).



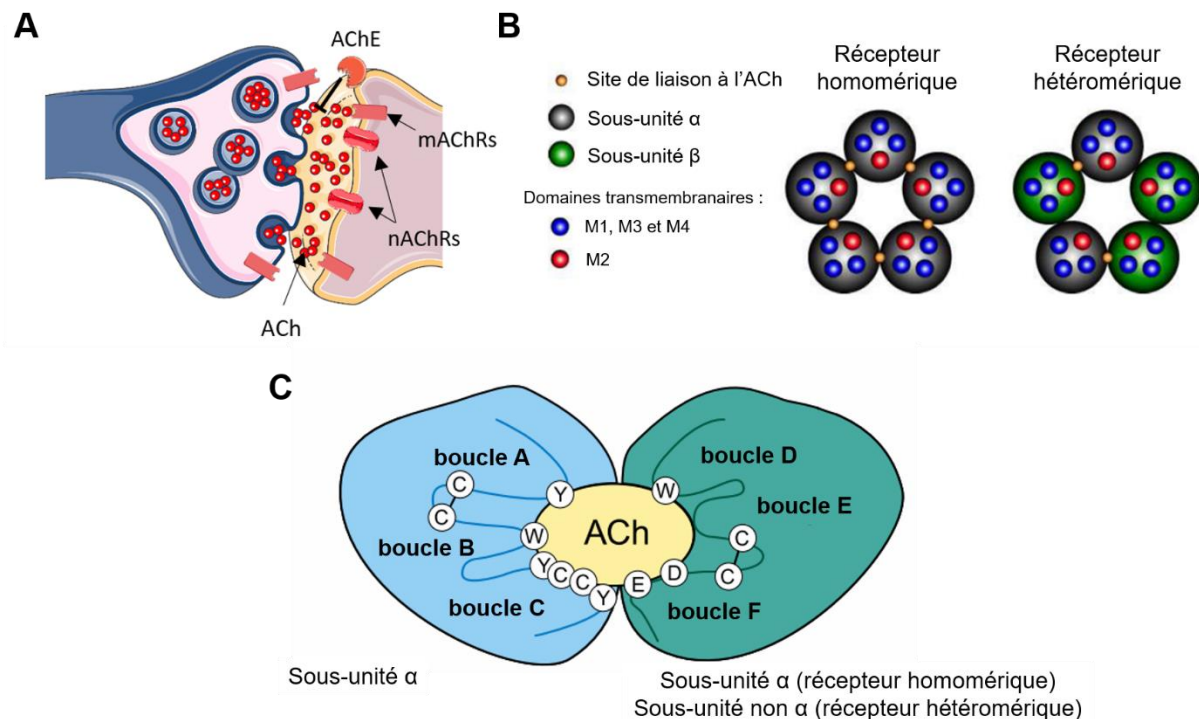


Figure 16 : Les récepteurs cholinergiques de type nicotinique. A) Schéma représentant la synapse cholinergique, B) la structure du récepteur nicotinique et, C) les boucles d'acides aminés impliquées dans la fixation de l'ACh à l'interface de deux sous-unités. ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase ; nACHRs : récepteurs cholinergiques de type nicotinique ; mACHRs : récepteurs cholinergiques de type muscarinique (Modifié d'après Matsuda *et al.*, 2001).

Chez l'insecte, l'activité des nACHRs est régulée par des voies de signalisation intracellulaire impliquant des sites de phosphorylation pour les protéines kinases A, G et C (PKA, PKC, PKG) caractérisés chez plusieurs espèces comme *D. melanogaster*, *Heliothis virescens*, *Myzus persicae*, *Apis mellifera*, *An. gambiae*, *Bemisia tabaci* et *P. americana* (Courjaret et Lapied, 2001; Thany *et al.*, 2007; Stokes *et al.*, 2015; Mannai *et al.*, 2016). Sur les neurones de blatte *P. americana*, l'activité des nACHRs est aussi régulée par des voies de signalisation calcium-dépendantes impliquant l'AMPC, la PKA, le complexe calcium-calmoduline et des isoformes de la CaMKII qui augmentent ou diminuent la sensibilité des nACHRs aux agonistes et aux insecticides néonicotinoïdes (Thany *et al.*, 2007; Bodereau-Dubois *et al.*, 2012; Calas-List *et al.*, 2013; List *et al.*, 2014; Raymond *et al.*, 2017).

Les nACHRs sont souvent co-exprimés avec des sous-unités auxiliaires. Les protéines caractérisées chez *D. melanogaster* de ce type sont RIC-3 (résistance à l'inhibiteur de l'acétylcholinestérase-3, 11 isoformes connus) et Lynx (Ly-6/neurotoxin). Ces protéines interviennent dans la maturation des nACHRs en participant par exemple aux processus de



repliements structurels et d'assemblage (Lansdell *et al.*, 2008; Raymond *et al.*, 2017). Les protéines Lynx sont aussi impliquées dans l'augmentation de l'amplitude du courant généré par l'imidaclopride sans pour autant changer la sensibilité du récepteur à cet agoniste ni les courants générés par l'acétylcholine chez *Nilaparvarta lugens* et *Locusta migratoria manilensis* (Yang *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2015b). Elles sont spécifiques de certains sous-types de nAChRs. Des changements du niveau d'expression de ces protéines pourraient donc moduler la sensibilité de ces récepteurs aux insecticides.

Les nAChRs constituent de nouvelles cibles de choix dans le contexte actuel difficile de la LAV. Plusieurs classes d'insecticides ciblent les nAChRs : les néonicotinoïdes, les mésoioniques, les sulfoximines, les buténolides (Cordova *et al.*, 2016; Holyoke *et al.*, 2017; Ihara *et al.*, 2017; Casida, 2018; Watson *et al.*, 2021). Que les insecticides soient des agonistes (néonicotinoïdes, buténolides) ou des antagonistes (mésoioniques) de ces récepteurs, ils seront certainement d'une utilité indéniable dans la lutte chimique contre les moustiques vecteurs d'agents pathogènes dans les années à venir car les moustiques n'ont été que très peu exposés à ce type de molécules et le risque de résistance s'en trouve donc très faible (Lees *et al.*, 2019). L'accent sera mis dans cette introduction sur les insecticides néonicotinoïdes et mésoioniques qui font l'objet de ce travail de thèse.

### **Les insecticides néonicotinoïdes**

Les extraits de plants de tabac ont été introduits en 1690 dans le contrôle des insectes ravageurs de cultures (Ujváry, 1999). Parmi les principaux bio-insecticides retrouvés dans ces plants comme le pyrèthre ou la roténone se trouve la nicotine. L'activité insecticide des premiers dérivés synthétiques de cette dernière était limitée par une faible pénétration de la molécule dans le système nerveux des insectes (Yamamoto, 1999). La recherche de meilleurs dérivés a donc continué pour aboutir en 1990 à l'introduction du premier néonicotinoïde, l'imidaclopride, portant un groupement chloropyridynil et un groupement nitroimine. Il est longtemps resté l'insecticide le plus vendu au monde (Matsuda *et al.*, 2020; Sparks et Bryant, 2021). Plusieurs autres dérivés ont ensuite été synthétisés et sont caractérisés par des groupements chimiques actifs variés (**Figure 17**) (Casida, 2018).

Cette classe d'insecticides est principalement utilisée en agriculture pour lutter contre une large diversité d'insectes ravageurs de cultures comme les pucerons, les cicadelles, les doryphores, les charançons et les carpocapses. Grâce à la haute solubilité dans l'eau et à la forte diffusion du néonicotinoïde, les traitements sont systémiques et peuvent être faits sur les feuilles,

les graines, le sol. Suite à l'évaluation de la nocivité de ces molécules pour les abeilles en 2013 par l'EFSA, leur usage a été grandement restreint puis interdit en 2018 en France et les agriculteurs peinent à trouver des alternatives aussi efficaces, si bien que des dérogations sont faites pour permettre l'usage des néonicotinoïdes sous certaines conditions (Goulson, 2018).

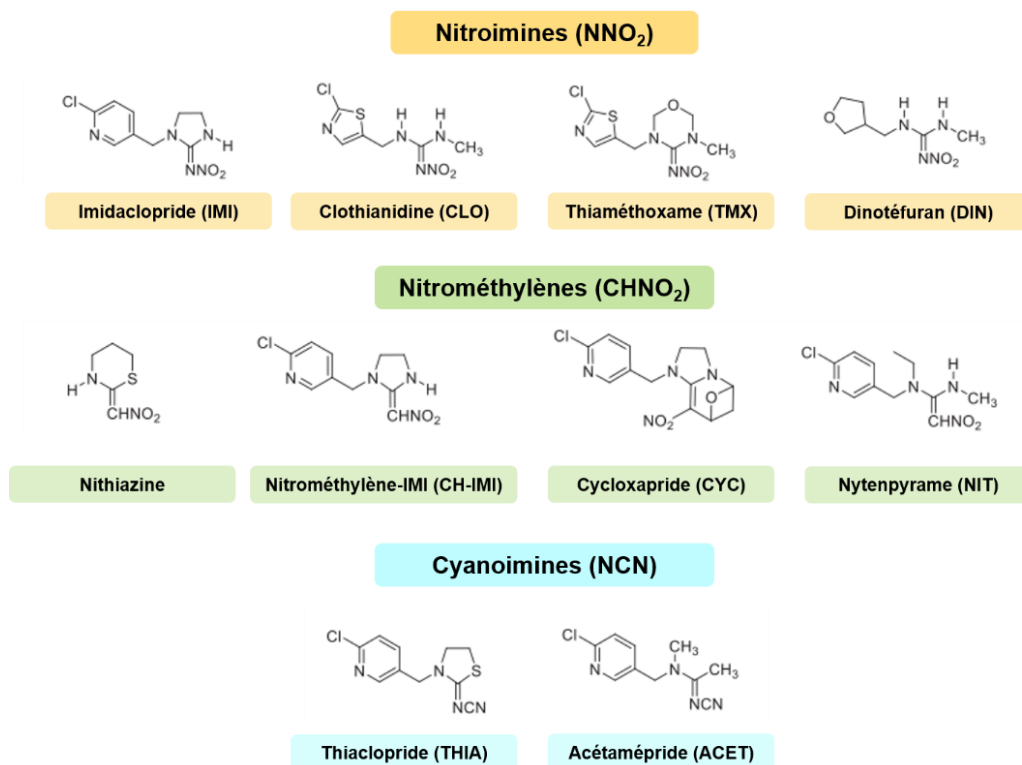


Figure 17 : Représentation de la structure chimique des différents néonicotinoïdes (Modifié d'après Casida, 2018).

Ces insecticides agissent comme des agonistes pleins ou partiels des nAChRs en imitant l'effet du neurotransmetteur endogène, l'acétylcholine. Ils sont en effet capables de se lier au site orthostérique du récepteur en interagissant avec les boucles A, B, E, F mais plus particulièrement les boucles C et D (Matsuda *et al.*, 2020; Shimada *et al.*, 2020). Ces insecticides sont très spécifiques des nAChRs d'insectes comparés aux nAChRs de mammifères, avec des ratios de sélectivité de l'ordre de 3000 pour certains néonicotinoïdes (Tomizawa et Casida, 2005; Casida, 2018). Des expériences de docking moléculaire et d'électrophysiologie sur plusieurs espèces d'insectes ont déterminé que certains néonicotinoïdes comme l'imidaclopride sont majoritairement des agonistes partiels des nAChRs d'insectes alors que d'autres comme la clothianidine ou l'acétamépride sont plutôt des agonistes pleins ou même des super-agonistes (Tan *et al.*, 2007; Simon-Delso *et al.*, 2015). Pour rappel, un agoniste partiel peut induire une réponse proportionnelle au nombre de récepteurs occupés mais même en occupant tous les

récepteurs il ne peut atteindre l'effet maximum atteignable par un agoniste complet. Un super agoniste induit un effet plus important que l'agoniste de référence pour le récepteur considéré. L'affinité de chaque néonicotinoïde est cependant dépendante du sous-type de nAChR concerné, mais aussi de plusieurs facteurs cellulaires comme l'état de phosphorylation du récepteur ainsi que son état conformationnel (Nauen *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2006; Bodereau-Dubois *et al.*, 2012; Taillebois *et al.*, 2018). Il a été montré que l'augmentation de la concentration en AMPc dans le cytoplasme par une adénylate cyclase sensible au complexe calcium-calmoduline active la PKA qui inhibe la réponse des nAChRs de type nAChR1 à l'imidaclopride, un insecticide néonicotinoïde, via des mécanismes de phosphorylation sur des neurones de blattes *P. americana*. Pour des concentrations élevées d'AMPc, la déphosphorylation du récepteur est alors favorisée et catalysée par une phosphatase régulée par la protéine kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline de type II (CaMKII) (Courjaret et Lapied, 2001).

La fixation de l'insecticide au niveau postsynaptique sur le nAChR induit une stimulation continue du neurone. On observe donc une augmentation de la fréquence de décharge des potentiels d'action avant une inhibition totale de la transmission synaptique cholinergique, un vidage des stocks d'ATP, puis la mort de l'insecte (Matsuda *et al.*, 2020). Ils sont aussi capables d'induire une désensibilisation par l'agoniste des nAChRs, c'est-à-dire de provoquer à forte concentration un changement de conformation du récepteur de telle sorte que celui-ci n'est plus capable de conduire les ions au travers de la membrane malgré la stimulation par l'agoniste (Quick et Lester, 2002; Giniatullin *et al.*, 2005).

Ces insecticides commencent seulement à être utilisés en LAV, avec des formulations comme SumiShield™ 50WG dont la molécule active est la clothianidine et Fludora Fusion® dont les molécules actives sont la clothianidine et la deltaméthrine (Oxborough *et al.*, 2019; Fongnikin *et al.*, 2020). Elles sont principalement utilisées en pulvérisation intra-domiciliaire.

### **Les insecticides mésoioniques**

Les insecticides mésoioniques (Ihara *et al.*, 2017, Watson *et al.*, 2021) sont une nouvelle classe d'insecticides prometteurs dans de nombreux domaines. Au début des années 1990, DuPont Crop Protection a cherché à optimiser des produits fongicides permettant la découverte du proquinazid, en modifiant la structure chimique de certains composés de sa collection interne. Au cours de ce programme, plusieurs sous-produits ont été générés, dont le triflumézopyrime et le dicloromézotiaz (**Figure 18**) (Holyoke *et al.*, 2017). Ne présentant pas l'activité fongicide recherchée à l'époque, ces produits seront mis à l'écart jusqu'à ce que des études ultérieures

démontrent leur activité insecticide sur plusieurs espèces d'insectes ravageurs de culture et particulièrement sur les hémiptères et lépidoptères (Holyoke *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016).

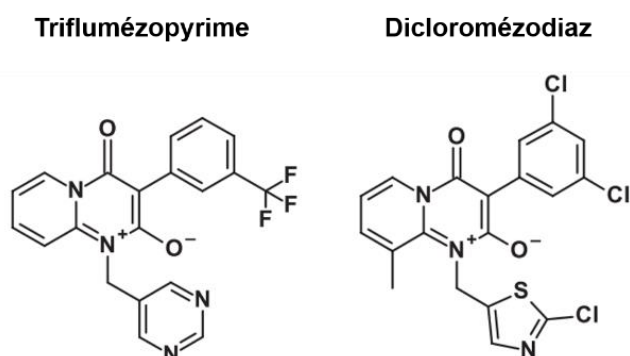


Figure 18 : Représentation de la structure chimique du triflumézopyrime et du dicloromérodiaz (Holyoke *et al.*, 2017).

Les composés mésoioniques sont des molécules dipolaires, c'est-à-dire que dans ces molécules le barycentre des charges positives ne coïncide pas avec celui des charges négatives. Ils possèdent un cœur pyridopyrimidine-dione et ont la particularité d'exister sous formes de tautomères positifs ou négatifs (**Figure 19**) (Holyoke *et al.*, 2017).

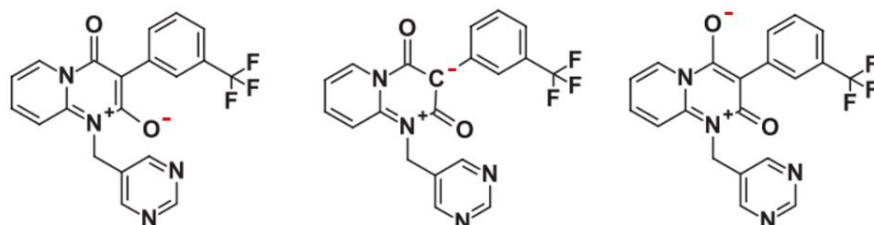


Figure 19 : Représentation de la structure chimique de 3 tautomères négatifs du triflumézopyrime (Modifié d'après Holyoke *et al.*, 2017).

Les insecticides mésoioniques sont des antagonistes compétitifs des récepteurs cholinergiques de type nicotinique. Ils ont la capacité de se fixer au site orthostérique du nAChR servant à fixer l'ACh et de déplacer l'imidaclopride lorsqu'il est fixé sur ce site (Cordova *et al.*, 2016). L'inhibition du récepteur par l'insecticide induit une intoxication léthargique chez les blattes ainsi que chez les pucerons et les cicadelles. L'activité insecticide du triflumézopyrime n'est pas encore parfaitement connue. Il pourrait maintenir le récepteur dans un état de repos ou désensibilisé, mais des études électrophysiologiques sur canal unique seraient nécessaires pour déterminer plus précisément son mode d'action.

## Chapitre 3 : La résistance vis-à-vis des insecticides et répulsifs utilisés en LAV

L'utilisation croissante des insecticides en LAV au cours de ces dernières décennies a conduit à l'émergence et à l'augmentation des résistances chez les moustiques vecteurs (Kleinschmidt *et al.*, 2018; Wilson *et al.*, 2020). En effet, l'utilisation des telles molécules induit une pression de sélection très forte sur les populations de moustiques vecteurs, favorisant la survie des individus naturellement résistants à ces produits. Ceux-ci ont donc plus d'opportunités pour se reproduire et devenir la population majoritaire tant que le traitement insecticide est appliqué (Machani *et al.*, 2020).

Selon l'OMS, la résistance aux insecticides est la capacité d'un insecte à survivre à l'exposition à une dose standard d'insecticide, à cause d'une adaptation physiologique ou comportementale héréditaire (OMS, 2018a). Il est en effet nécessaire de différencier les mécanismes de résistances héréditaires des mécanismes d'accommodations qui sont mis en place durant la vie de l'insecte et qui ne seront pas transmis aux générations suivantes. La première étude rapportant un phénomène s'apparentant à de la résistance aux insecticides date de plus de 100 ans et décrit une baisse d'efficacité de la chaux sur les poux de San José *Diaspidiotus perniciosus* (Melander, 1914).

La résistance à une classe d'insecticides est généralement conférée par une modification physiologique. Cependant, un mécanisme peut conférer une résistance à plus d'une classe d'insecticide, on parle alors de résistance croisée. Il y a aussi la résistance multiple, dans ce cas plusieurs mécanismes distincts conférant une résistance à plusieurs molécules insecticides. La résistance multiple peut affecter plusieurs familles d'insecticides. Il n'est pas rare que dans les populations de vecteurs, voire dans le même insecte, plusieurs mécanismes de résistance co-existent dû à l'exposition à plusieurs types d'insecticides. Il est aussi possible qu'une population de moustiques devienne résistante à un insecticide auquel elle n'a jamais été exposée grâce au phénomène de résistance croisée (CNEV, 2014; Moyes *et al.*, 2021).

La résistance aux insecticides dans une population de vecteurs peut rendre les moyens de lutte moins efficaces. Dans sa forme la plus extrême, la résistance aux insecticides conduit à un échec du contrôle puis à une inefficacité totale du traitement pour réduire la densité de la population d'insectes ciblée et la transmission des maladies vectorielles. La réduction d'efficacité du traitement dépend du type, du nombre, de la fréquence des mécanismes de résistance et donc

de l'intensité de la résistance induite par ces mécanismes. Sur le terrain, le niveau de résistance est évalué par des techniques de bioessais, de biochimie ou de biologie moléculaire. Ils permettent d'évaluer la présence, l'absence, la fréquence des allèles de résistance (OMS, 2005; CNEV, 2014). Une méta-analyse prédit un impact épidémiologique négatif très fort sur l'efficacité des moustiquaires imprégnées dû à l'extension de la résistance aux pyréthrinoïdes, même pour des intensités de résistance faible. Les plans de surveillance et de gestion de la résistance sont donc primordiaux (Churcher *et al.*, 2016; OMS, 2019).

Plusieurs types de mécanismes de résistance ont été identifiés et peuvent être classés dans les catégories suivantes : 1) la résistance métabolique, 2) la mutation des cibles d'insecticides, 3) la résistance cuticulaire, 4) la séquestration des insecticides et 5) les changements comportementaux (**Figure 20**) (CNEV, 2014; Sparks et Nauen, 2015; Ranson et Lissenden, 2016; Ingham *et al.*, 2018; Ingham *et al.*, 2020).

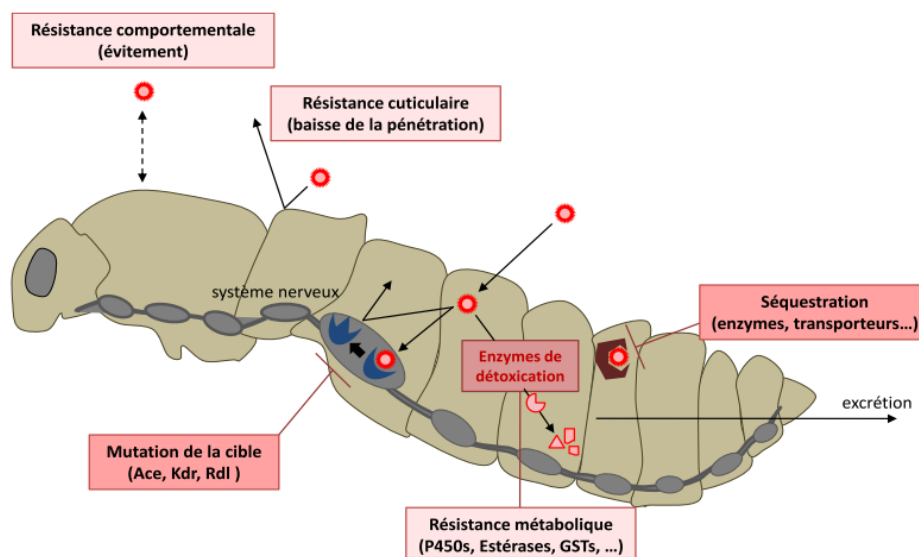


Figure 20 : Principaux mécanismes de résistance aux insecticides chimiques (CNEV, 2014).

Le plus gros problème est posé par la résistance aux pyréthrinoïdes qui sont les principaux insecticides utilisés en santé publique. Cependant, des résistances à toutes les classes d'insecticides les plus communément utilisées ont émergé dans les populations de moustiques vecteurs d'agents pathogènes (**Tableau 3**) (CNEV, 2014).

Familles d'insecticides	Cible biochimique				Mécanismes de résistance connus				
	Canaux sodium	AChE	Recepteur GABA	Recepteur ACh	Mutation de la cible <sup>a</sup>		Métaboliques		
							COE	GST	P450
Organochlorés	X				<i>kdr</i>		++	+	
Cyclodiènes			X		<i>Rdl</i>			+	
Organophosphorés		X			<i>ace R</i>	++	+	+	
Carbamates		X			<i>ace R</i>	++		+	
Néo-nicotinoïdes				X	Mu nAChR			++	
Pyréthroïdes	X				<i>kdr</i>	+	+	++	
Phénylpyrazoles			X		<i>Rdl</i>			+	
Avermectines			X		non décrite			+	
Spinosad			X	X	Mu nAChR			+	
Régulateurs de croissance (IGR)		Récepteurs hormonaux			mutation des récepteurs				+
<i>Toxines de Bti</i>		Récepteurs de la paroi intestinale des larves de diptères			mutations des récepteurs		altération des toxines ? immunité ? autres ?		
<i>Toxine de Bs</i>									

<sup>a</sup> *kdr*: knockdown resistance, *Rdl*: Résistance dieldrin, *ace R*: acetylcholinestérase insensible, Mu nAChR: Mutations du récepteur nicotinique de l'acétylcholine

Tableau 3 : Mécanismes de résistance associés aux différentes classes d'insecticides utilisées en LAV (CNEV, 2014).

Il est donc primordial d'empêcher l'émergence et la diffusion des mécanismes de résistance pour conserver l'efficacité des techniques de contrôle des populations vectrices et de protection personnelle qui ont permis le décroît progressif du nombre de cas de paludisme (OMS, 2016; OMS, 2019).

## 1. Mécanismes de résistance aux insecticides

### 1.1. Résistance métabolique

La résistance métabolique comprend tous les mécanismes biochimiques qui permettent de dégrader l'insecticide en métabolites moins toxiques, voire inactifs, avant qu'il ne puisse agir. Les sous-produits sont plus faciles à excréter et la quantité d'insecticide atteignant la cible s'en trouve diminuée. L'identification précise des gènes impliqués dans la résistance est complexe, lourde, et nécessite d'utiliser des approches transcriptomiques couplées à des méthodes de biologie fonctionnelle.

Ces mécanismes biochimiques impliquent des enzymes endogènes de détoxification appartenant aux familles des monooxygénases telles que les cytochromes P450 (P450s), des glutathion S-transférases (GSTs) ou des carboxylestérases (COEs) qui agissent sur une large

gamme de xénobiotiques dont les insecticides chimiques (David *et al.*, 2013; Liu, 2015; OMS, 2016; Nauen *et al.*, 2021). Ces enzymes sont généralement surexprimées chez les insectes résistants.

Les P450s sont des enzymes hème-thiolate codées par les gènes de la famille *CYP* qui interviennent dans des réactions telles que les hydroxylations, déalkylations, époxydations, oxydations dans tous les organismes vivants. Cette famille de gènes est fortement associée à la résistance aux pyréthrinoïdes chez de nombreuses espèces de moustiques du genre *Aedes* et *Anopheles*. L'expression des gènes *AgCYP6P3*, *AgCYP6M2*, *AgCYP9K1* a notamment été associée à la résistance aux pyréthrinoïdes et au DDT chez le moustique *An. gambiae*. (Vontas *et al.*, 2020). Ces enzymes sont responsables de l'hydroxylation des cycles qui composent une partie de la structure chimique des pyréthrinoïdes, ce qui rend l'insecticide non toxique et plus facilement excrétable (Feyereisen, 2005).

Les GSTs permettent l'ajout d'un groupement glutathion par conjugaison et la déchloration des organochlorés. Il existe 6 classes de GSTs (sigma, epsilon, delta, theta, zeta, kappa). Les GSTs delta et epsilon ont été associées à la résistance à plusieurs insecticides chez le moustique *An. gambiae*. La *AgGSTε2* est par exemple capable de métaboliser le DDT en métabolites non toxiques (1,1-dichloro-2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)ethane (DDD) et 1,1-dichloro-2,2-bis-(p-chlorophenyl)ethane (DDE)) qui sont facilement excrétés par l'insecte (Marimo *et al.*, 2016).

Les estérases catalysent l'hydrolyse de liaisons ester. Ces enzymes sont majoritairement associées à la résistance aux OP et CX, mais il a été montré chez les moustiques *An. gambiae*, *A. aegypti* et *C. quinquefasciatus* qu'elles pouvaient aussi métaboliser la perméthrine, qui fait partie des pyréthrinoïdes de type I (Aizoun *et al.*, 2013). Le génotype le plus commun (>90% des individus résistants chez le moustique *C. quinquefasciatus*) est l'augmentation de l'expression des gènes *esta2* et *estβ2*.

Toutes ces enzymes de détoxification agissent individuellement sur la molécule cible ou en combinaison successive pour détoxifier l'insecticide en plusieurs phases si nécessaire. Par exemple, dans les réactions de phase 1, les P450s et les COEs ajoutent des groupements hydroxyle et carboxyle qui vont augmenter la conjugaison par les enzymes de phase 2 comme les GSTs. En phase 3, les composés conjugués en phase 1 et 2 sont fixés par des transporteurs cellulaires comme les ATP-binding cassettes (ABC) qui empêchent la toxicité de la molécule cible



et la font sortir de la cellule (Dermauw et Van Leeuwen, 2014). Les enzymes de détoxication et les ABC sont aussi impliquées dans la séquestration des insecticides.

Le nombre de publications qui traitent de l'implication des enzymes de détoxication dans la résistance aux insecticides a considérablement augmenté ces 10 dernières années (Djouaka *et al.*, 2008; Marimo *et al.*, 2016; Mavridis *et al.*, 2019; Weedall *et al.*, 2019; Nauen *et al.*, 2021). Cependant, les gènes qui codent ces protéines sont extrêmement nombreux et souvent régulés par d'autres gènes, qui pourraient être impliqués dans le mécanisme de résistance (Vontas *et al.*, 2020). Parmi ces gènes régulateurs, on compte par exemple les facteurs de transcription. Tout changement dans le niveau d'expression ou dans l'activité de ces facteurs d'expression induit donc de fortes répercussions sur le phénotype de l'insecte vis-à-vis des insecticides. Plusieurs facteurs de transcription ont été identifiés comme de bons candidats à étudier pour évaluer leur impact sur les mécanismes de résistance car ils sont impliqués dans la régulation de l'expression de nombreuses enzymes de détoxication. C'est le cas des facteurs de transcription Maf-S, Met et Dm chez *An. gambiae*. La diminution de l'expression de l'un de ces trois facteurs de transcription induit une augmentation de la sensibilité aux pyréthrinoïdes d'une souche résistante en diminuant de la synthèse d'enzymes de détoxification (Ingham *et al.*, 2017; Ingham *et al.*, 2018).

Les résistances métaboliques sont détectées à l'aide de tests toxicologiques (bioessais avec synergiste capable d'inhiber les enzymes de détoxification comme le PBO) et biochimiques (tests d'activité enzymatique globale et mesure du niveau d'expression).

## 1.2. Mutation des cibles d'insecticides

Lorsqu'une mutation génétique induit une modification de la séquence en acides aminés d'une cible d'insecticide, on parle de résistance par modification de la cible. Cette mutation a pour effet de réduire ou d'empêcher complètement l'insecticide d'agir en diminuant son affinité pour celle-ci (OMS, 2018). La mutation d'un seul acide aminé peut être suffisante pour induire la résistance.

Malgré le caractère aléatoire de l'apparition de ces modifications, les mêmes mutations sont souvent sélectionnées indépendamment sous la pression de sélection des insecticides dans différentes régions et chez différentes espèces (Eleftherianos *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2014; Bkhache *et al.*, 2019; Fagbohun *et al.*, 2020). Elles sont liées aux contraintes structurales qui

s'exercent sur la protéine cible qui doit à la fois avoir une affinité réduite pour l'insecticide tout en étant compatible avec son fonctionnement physiologique chez l'insecte.

Chez *An. gambiae s.l.* et plus généralement chez les anophèles, les deux mutations retrouvées les plus fréquemment se trouvent sur le canal sodium dépendant du potentiel (*kdr*) et sur l'acétylcholinestérase de type 1 (*ace-1<sup>R</sup>*) au niveau neuronal (**Figure 21**) (Matambo *et al.*, 2007; Pwalia *et al.*, 2019; Chukwuekezie *et al.*, 2020). Il a été montré chez ces moustiques mais aussi chez d'autres espèces d'insectes qu'un individu peut porter plusieurs allèles de résistance de façon concomitante pour chacune des familles d'insecticides (Dabiré *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Assogba *et al.*, 2014). Il existe aussi les mutations Rdl A296G et A296S (« resistance to dieldrin locus ») sur le récepteur au GABA, mais dans le cadre de ce travail de thèse elles ne seront pas présentées (Du *et al.*, 2005).



Figure 21 : Carte des résistances kdr et ace-1R rapportées par des bioessais OMS/CDC ou des publications chez les anophèles (nombre de bioessais/publication indiqué en couleur) (VectorBase.com, 2021).

### Mutation du canal sodium dépendant du potentiel chez *An. gambiae*.

Dans certaines régions de Côte d'Ivoire ou du Cameroun par exemple, les études de suivi de la fréquence des gènes de résistance réalisées sur *An. gambiae* montrent que la résistance *kdr* peut être présente chez plus de 90% des individus (Zoh *et al.*, 2018; Oumbouke *et al.*, 2020). De plus en plus de moustiques deviennent résistants aux pyréthrinoïdes grâce à la substitution d'un acide aminé dans la sous-unité *para* qui forme le pore du canal. Ces mutations ponctuelles affectent des résidus impliqués dans la fixation de l'insecticide et confèrent la résistance à l'effet knock-down des pyréthrinoïdes (knock-down resistance, « *kdr* ») (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Plusieurs acides aminés peuvent donc être substitués pour réduire la sensibilité du canal aux pyréthrinoïdes. Les mutations connues à ce jour dans le canal sodium du moustique *An. gambiae* sont la **L1014F** (leucine TTA-phénylalanine TTT) majoritaire en Afrique de l'Ouest, la **L1014S** (leucine TTA-sérine TCA) majoritaire en Afrique de l'Est et la **N1575Y** (asparagine AAT-tyrosine TAT). Ces mutations sont toutes rapportées dans de nombreux pays d'Afrique (Silva *et al.*, 2014). La mutation L1014F/S se situe sur le segment 6 dans le domaine II de la sous-unité *para* du canal sodium, dans le pore du canal (Lol *et al.*, 2013) tandis que la mutation N1575Y se situe dans la boucle intracellulaire entre le domaine III et IV (**Figure 22**). Cette dernière, qui n'est présente que chez les moustiques présentant déjà la mutation L1014F chez *An. gambiae*, donne un profil de résistance encore plus élevé aux pyréthrinoïdes et pourrait compenser le coût génétique associés à la mutation L1014F (Jones *et al.*, 2012). On parle alors d'individus « *super-kdr* ».

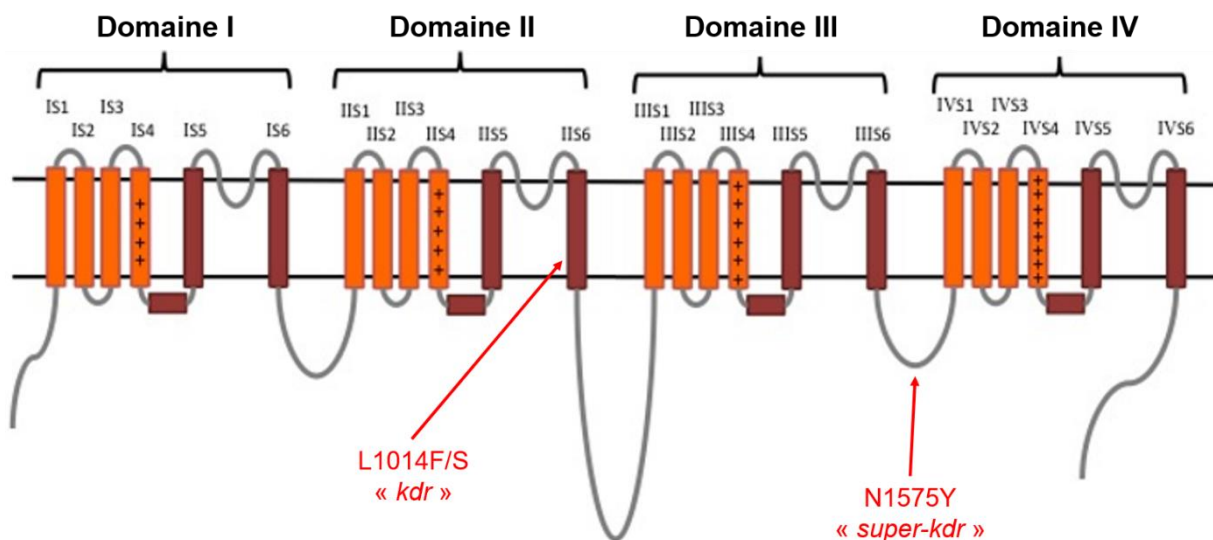


Figure 22 : Localisation des mutations *kdr* dans la sous-unité *para* du canal sodium d'*An. gambiae*.

### **Mutation de l'acétylcholinestérase chez *An. gambiae*.**

Les études de suivi de la fréquence des gènes de résistance *ace-1<sup>R</sup>* réalisées sur *An. gambiae* montrent que la résistance peut être présente chez plus de 40% des individus (Elanga-Ndille *et al.*, 2019; Oumbouke *et al.*, 2020). L'acétylcholinestérase est la cible des OP et des CX qui se fixent sur le site catalytique de l'enzyme. Chez le moustique *An. gambiae*, le gène *ace-1* codant l'AChE1 est muté, donnant la substitution **G119S** (glycine GGC-sérine AGC) dans le site catalytique de la protéine (Weill *et al.*, 2004). Cette mutation est responsable d'un encombrement stérique qui empêche les insecticides d'atteindre et de se fixer sur le site catalytique de l'enzyme (Carlier *et al.*, 2017; Cheung *et al.*, 2018). La sensibilité de l'AChE aux OP et CX est d'ailleurs bien corrélée au statut de résistance de l'insecte (Weill *et al.*, 2004). Par contre, cette mutation entraîne un fort coût génétique causant une mortalité accrue des nymphes de moustiques *An. gambiae*, ce qui donne un avantage sélectif aux individus sensibles en absence d'insecticide et qui faciliterait la gestion de cette résistance (Djogbénu *et al.*, 2010).

### **1.3. Résistance cuticulaire**

La partie externe de l'exosquelette des insectes, la cuticule, sert à une grande variété de fonctions physiologiques comme la protection contre la dessiccation, la perception sensorielle, le support mécanique. C'est aussi la première barrière face aux composés externes comme les insecticides (Yahouédo *et al.*, 2017; Balabanidou *et al.*, 2018; Balabanidou *et al.*, 2019). Les insecticides agissent par contact pour atteindre le système nerveux. Pour y arriver, ils doivent d'abord pénétrer dans l'insecte en traversant cette cuticule. La résistance cuticulaire intervient lorsque l'insecte présente un épaissement de la cuticule externe, interne ou les deux, ou lorsque la composition de la cuticule est modifiée (**Figure 23**) (Balabanidou *et al.*, 2018). Ce mécanisme réduit la pénétration de l'insecticide dans l'insecte et est souvent présent en plus d'autres mécanismes de résistance.

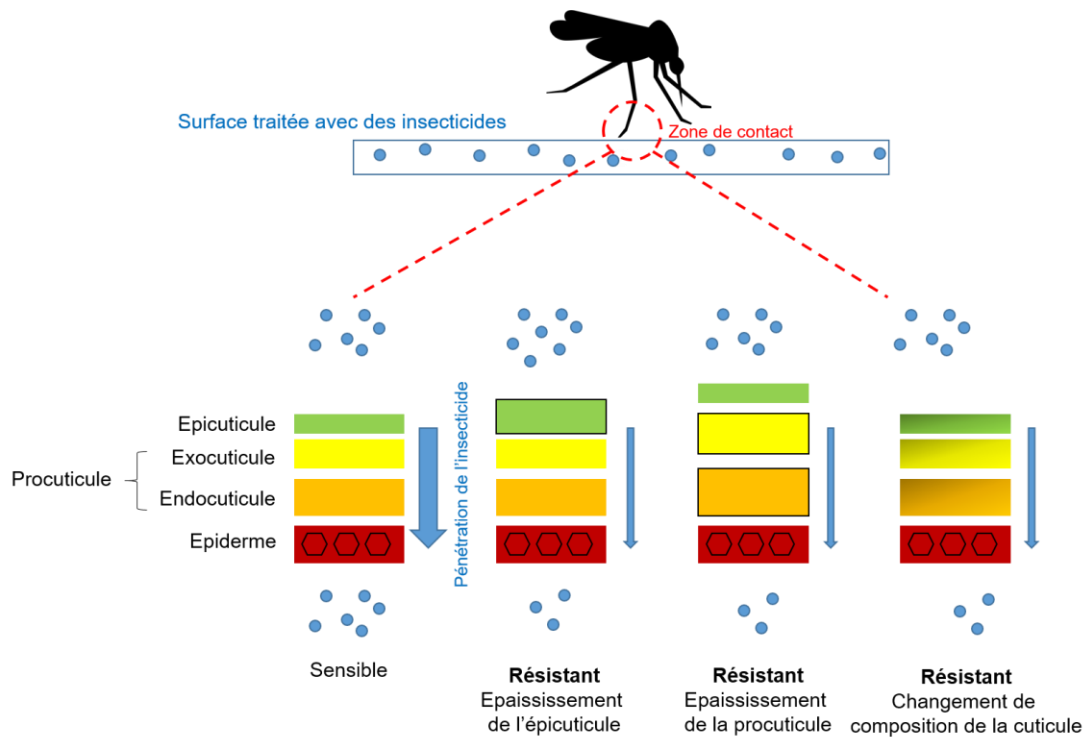


Figure 23 : Mécanismes de résistance cuticulaire (Modifié d'après Balabadinou *et al.*, 2018).

Un épaississement de la cuticule donnant une résistance aux pyréthriinoïdes a déjà été rapporté chez plusieurs insectes ravageurs de culture (Ahmad *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2012; Koganemaru *et al.*, 2013). Chez le moustique *An. gambiae*, il a été montré que la pénétration d'insecticide dans des individus issus d'une souche sélectionnée pour sa résistance métabolique et cuticulaire était réduite (Yahouédo *et al.*, 2017). Chez cette souche appelée MRS, les gènes surexprimés impliqués dans l'épaississement de la cuticule (*CYP6M2* et *CYP6P3*) sont souvent surexprimés dans les populations sauvages en Afrique de l'Ouest. Ces gènes codent des enzymes de détoxification qui participent également à la métabolisation des pyréthriinoïdes et il existe donc une association certaine entre les mécanismes de résistance cuticulaire et métabolique (Balabanidou *et al.*, 2016; Yahouédo *et al.*, 2017). Cette hypothèse est confirmée par une analyse transcriptomique comparant des moustiques *An. gambiae* sensibles et résistants aux pyréthriinoïdes provenant du Kenya dans lesquelles ces enzymes sont aussi surexprimées et participent à la détoxification et à l'épaississement de la cuticule (Bonizzoni *et al.*, 2012).

## 1.4. Séquestration des insecticides

Certaines protéines sont capables de se lier très rapidement et avec une haute affinité aux insecticides pour les empêcher d'atteindre leur cible, ce processus est appelé la séquestration. Enormément de protéines sont impliquées dans ce mécanisme de résistance, dont certains n'ont été identifiés que très récemment. Parmi ces protéines, on peut citer : les estérases de type  $\beta 2$  qui sont des protéines de détoxification (Hamid-Adiamoh *et al.*, 2020; Hemingway *et al.*, 2004), les protéines d'appendice sensoriel (SAP ; « sensory appendage protein ») (Ingham *et al.*, 2020), des transporteurs cellulaires comme les ATP binding cassette (ABC) (Dermauw et Van Leeuwen, 2014; Pignatelli *et al.*, 2018), les protéines salivaires de la famille D7 (Thomsen *et al.*, 2014; Isaacs *et al.*, 2018), les  $\alpha$ -crystallines qui sont des protéines chaperonnes (Ingham *et al.*, 2018) et les hexamérines qui sont des protéines de stockages (Seixas *et al.*, 2017).

## 1.5. Changements comportementaux

Les changements comportementaux comprennent toutes les modifications de l'activité du moustique qui lui permet d'éviter ou de limiter le contact avec l'insecticide.

Ces changements comportementaux peuvent être :

- Un évitement temporel : l'insecte change son rythme d'activité pour éviter les moments où les insecticides sont utilisés. Par exemple, un moustique peut favoriser une activité diurne plutôt que nocturne en zone de couverture avec des moustiquaires imprégnées.
- Un évitement spatial : le moustique limite les risques d'exposition aux insecticides en prenant son repas sanguin en extérieur plutôt qu'en intérieur.
- Un évitement trophique : le moustique limite les risques d'exposition aux insecticides en choisissant des hôtes qui ne sont pas associés à l'usage d'insecticides. Dans ce cas, il favoriserait la zoophilie plutôt que l'anthropophilie.

Malgré leur impact certain sur le contrôle du paludisme, il existe assez peu d'informations sur les changements comportementaux et leur hérédité comparées aux autres mécanismes de résistance (Gatton *et al.*, 2013; Sokhna *et al.*, 2013). Cela est dû en partie à la difficulté de construire des protocoles expérimentaux qui permettent d'identifier et de quantifier les changements de comportement qui pourraient exister sur le terrain. Il est pour l'instant

impossible de différencier un comportement d'évitement spécifiquement sélectionné par les insecticides et une certaine plasticité comportementale

Cependant, certains changements de comportement ont pu être identifiés chez les moustiques vecteurs de paludisme. En présence d'insecticide, il a par exemple été reporté que les anophèles pouvaient passer d'un comportement endophile (i.e. repos dans les habitations après le repas sanguin) à un comportement exophile (i.e. repos hors des habitations après le repas sanguin). D'autres études ont montré qu'après la mise en place des moustiquaires imprégnées d'insecticide, la prise de repas sanguin à l'extérieur était favorisée au détriment de la prise en intérieur ou que les heures de prise de ce repas sanguin étaient décalées pour favoriser le contact avec l'être humain (Fornadel *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2011).

Comme les changements comportementaux sont difficiles à caractériser, Carrasco et collaborateurs ont classés les mécanismes de résistance comportementale et ont ouvert des champs thématiques qui seront nécessaires à explorer dans les années à venir pour 1) mieux appréhender les interactions entre le moustique et son environnement, 2) mieux évaluer l'impact des résistances comportementales sur l'efficacité des traitements insecticides. Les mécanismes dont l'impact est encore inconnu sur l'efficacité de l'insecticide sont par exemple la thermorégulation du moustique, l'automédication par consommation de nourriture ou de composés qui réduiraient l'efficacité de l'insecticide ou encore une augmentation de fécondité qui viserait à compenser l'effet de l'insecticide sur cette dernière (**Figure 24**) (Carrasco *et al.*, 2019).



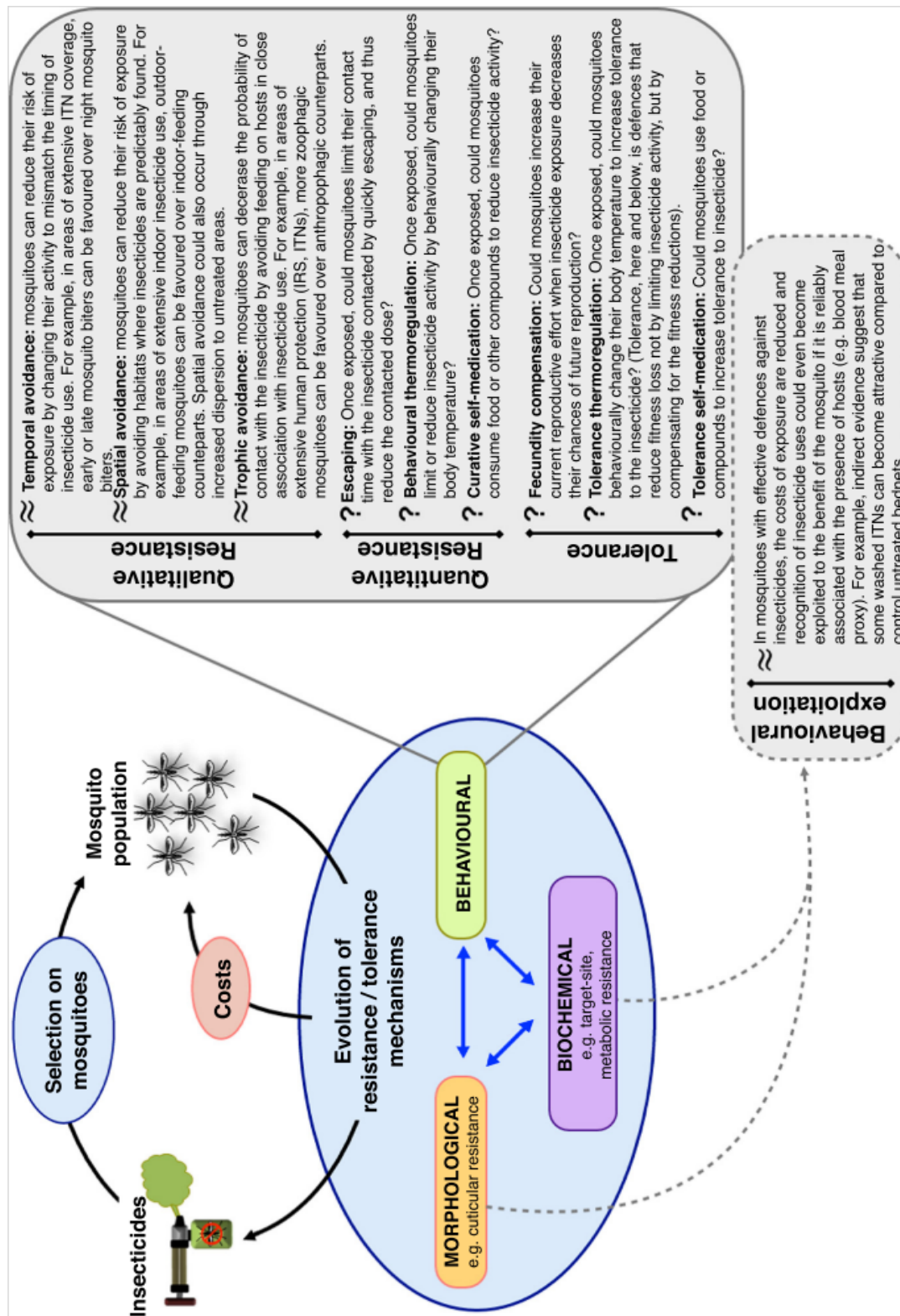


Figure 24 : Changements comportementaux connus et à investiguer chez le moustique (Carrasco et al., 2019).

## 2. Mécanismes impliqués dans la réduction de l'efficacité des répulsifs

Alors que les mécanismes de résistances aux insecticides sont très largement étudiés, assez peu d'informations sont disponibles sur les effets de l'exposition des insectes à des répulsifs.

Chez les nymphes hématophages de *Rhodnius prolixus*, une exposition prolongée au DEET induit un phénomène d'adaptation qui diminue l'effet répulsif. Cette adaptation ferait intervenir la voie de signalisation NO-cGMP intracellulaire (Sfara *et al.*, 2008; Sfara *et al.*, 2011). De même, chez la blatte *B. germanica*, l'exposition prolongée au DEET réduit son effet répulsif (Sfara *et al.*, 2016).

Chez les femelles *A. aegypti*, il a été montré qu'un trait génétique dominant mais pour l'instant inconnu serait responsable d'une réduction de la réponse comportementale à l'effet répulsif du DEET, voire d'une insensibilité totale. Les expériences d'électroantennographie menées dans cette étude montrent que ce phénomène serait induit par des changements fonctionnels au niveau des sensilles qui deviennent insensibles au DEET (Stanczyk *et al.*, 2010). Ces moustiques sont incapables d'associer le DEET avec la possibilité d'obtenir un repas sanguin après une phase d'apprentissage avec plusieurs expositions successives au DEET. Cependant, même si le moustique n'est pas attiré par le répulsif, son comportement vis-à-vis de celui-ci devient indifférent. Cela pourrait donc impacter l'efficacité du répulsif et ce mécanisme d'apprentissage pourrait être détecté chez d'autres espèces de moustiques avec des protocoles adaptés (Vinauger *et al.*, 2014; Mulatier, 2018).

Chez *An. gambiae*, Deletre et ses collaborateurs ont montré que la résistance aux insecticides par mutation de la cible modifie le comportement du moustique vis-à-vis des répulsifs (Deletre *et al.*, 2019). Dans cette étude, les bioessais réalisés pour évaluer l'effet répulsif du DEET et de plusieurs huiles essentielles montrent qu'une souche résistante aux OP n'est pas sensible à l'effet répulsif du carvacrol, mais est beaucoup plus sensible à celui du DEET que la souche sensible. Une autre souche résistante aux pyréthrinoïdes est plus sensible au cuminaldéhyde que la souche sensible.

Ces données prises dans leur ensemble mettent en exergue la complexité des mécanismes qui influencent la réponse aux répulsifs. En effet, les mécanismes de résistance croisée semblent exister entre les insecticides et les répulsifs. Par contre, les études des phénomènes de résistance, d'adaptation et d'habituation des moustiques aux composés répulsifs sont relativement peu nombreuses et récentes. Dans la mesure où ces composés présentent un intérêt pour les programmes de lutte intégrée et en protection personnelle, de futurs travaux devront être menés pour améliorer la compréhension de la plasticité comportementale des moustiques vis-à-vis des répulsifs (Abd-Ella *et al.*, 2015; El-Adouzi *et al.*, 2020; Moreau *et al.*, 2020).

### 3. Impact des résistances dans les populations de vecteurs

Malgré l'évidence du problème posé par l'apparition et la diffusion de la résistance, l'impact que celle-ci a sur l'efficacité des traitements et la transmission du paludisme est difficile à évaluer.

#### **Impact sur l'efficacité des traitements insecticides**

Même au sein de populations résistantes à un insecticide, le niveau de contrôle attendu peut être atteint en utilisant le même insecticide (OMS 2016a; Alout *et al.*, 2017). En effet, l'impact est mesuré en suivant les lignes directrices de l'OMS comparant le taux de survie de souches de moustiques ou de moustiques sauvages exposés aux insecticides en laboratoire (tests en cône, tests en tube) ou sur le terrain (cases expérimentales). Cependant, ces tests concernent un insecticide donné, avec une exposition forcée pendant un temps donné et une lecture de mortalité à 24h, ce qui n'implique pas qu'une réduction de la mortalité au test OMS soit associée à une réduction de l'efficacité du contrôle suffisante pour diminuer significativement la transmission de la maladie. Par exemple, un insecte résistant peut subir une mortalité différée par rapport à un insecte sensible exposé dans les mêmes conditions. Dans ce cas, une lecture de mortalité à 24h après l'exposition n'est pas suffisante pour déterminer l'effet global de l'insecticide sur un insecte résistant (Viana *et al.*, 2016). Un insecte résistant peut être affecté par un coût génétique qui va affecter sa durée de vie, sa compétence vectorielle ou son comportement de piqûre. Dans ce cas, le taux de transmission du pathogène n'est pas forcément affecté par la résistance (Rivero *et al.*, 2010; Alout *et al.*, 2017).

### **Impact sur la transmission du paludisme**

Bien que la résistance aux pyréthrinoïdes augmente la compétence vectorielle des moustiques infectés par *Plasmodium*, le coût généré par l'infection limite la durée de vie des moustiques résistants même en l'absence d'insecticide et restaure partiellement la sensibilité du moustique aux pyréthrinoïdes ou augmente sa mortalité en présence de DEET (Alout *et al.*, 2014; Alout *et al.*, 2016; Mulatier *et al.*, 2019). Il a aussi été montré que les moustiques portant la mutation *kdr* et *ace-1<sup>R</sup>* étaient moins facilement infectés par *P. falciparum* (Alout *et al.*, 2014). La résistance aux insecticides peut donc altérer l'interaction vecteur-pathogène à plusieurs niveaux résultant en un coût génétique fort qui peut diminuer la transmission du paludisme.

Il est donc nécessaire de préciser dans les années à venir l'impact réel de la résistance aux insecticides sur la transmission du paludisme en prenant en compte l'ensemble de ces données et de rechercher des stratégies efficaces, innovantes pour compenser ou contourner les phénomènes de résistances, particulièrement contre les moustiques infectés (Kleinschmidt *et al.*, 2018).

## Chapitre 4 : Les associations insecticide/agent synergisant pour contourner les phénomènes de résistance

### 1. L'utilisation d'un agent synergisant pour potentialiser l'effet des insecticides

#### 1.1. Le principe de l'agent synergisant

Pour contrôler l'impact des résistances chez les moustiques vecteurs de maladies et diminuer les doses d'insecticide utilisées, de nouvelles stratégies de LAV s'appuient sur la combinaison de plusieurs molécules à effets insecticides et/ou répulsifs, mais aussi sur l'utilisation de virus d'insectes. La probabilité de voir apparaître une résistance à deux molécules est plus faible que pour une seule molécule (Curtis, 1985). L'association de deux produits chimiques est donc particulièrement intéressante pour contourner les problèmes de résistances en LAV. Ce type de combinaison est recommandé par l'OMS dans le plan global de gestion de la résistance aux insecticides (OMS, 2012). L'utilisation d'agents synergisants chimiques ou biologiques potentialise l'efficacité des insecticides tout en réduisant les doses utilisées. L'effet provoqué par la combinaison est alors plus important que la somme des effets des molécules/agents biologiques pris séparément. L'agent synergisant est responsable d'une augmentation de la sensibilité de la cible à un insecticide (**Figure 25**) (Apaire-Marchais *et al.*, 2016; Raymond *et al.*, 2017; Deshayes *et al.*, 2018).

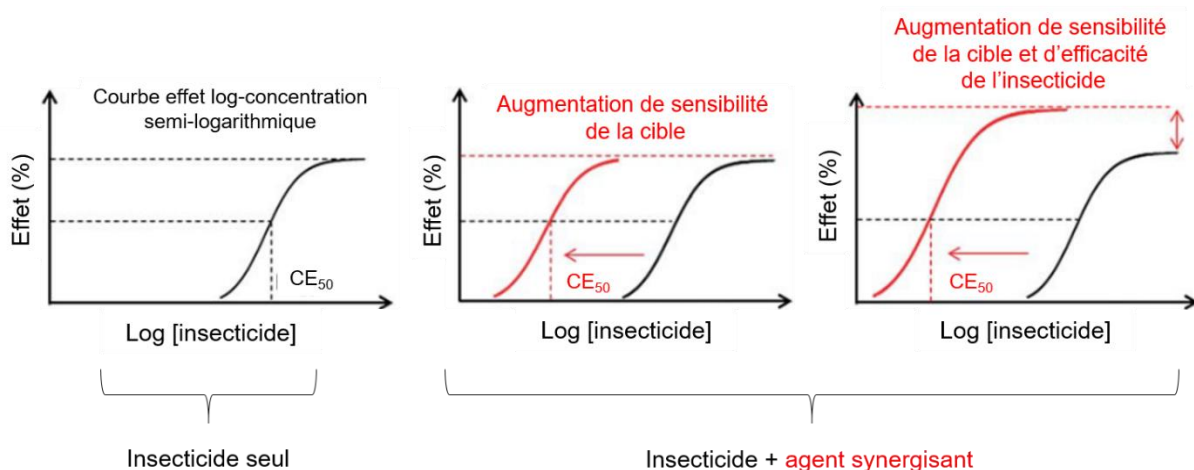


Figure 25 : Illustration de la potentialisation de l'effet d'un insecticide par combinaison avec un agent synergisant (Modifié d'après Apaire-Marchais *et al.*, 2016).

Les agents synergisants ne possèdent pas d'activité insecticide propre. Cela veut dire qu'à des concentrations très faibles, ils sont pour certains capables d'activer des voies de signalisation intracellulaire dépendantes du calcium impliquées dans l'augmentation de la sensibilité des cibles aux insecticides. Ces voies de signalisation, lorsqu'elles sont sollicitées, sont responsables d'un changement de conformation de la cible membranaire par des processus de régulation directs ou indirects *via* un processus de phosphorylation/déphosphorylation. Cela a pour effet d'augmenter l'efficacité de l'insecticide tout en réduisant les doses utilisées et de permettre de contourner des phénomènes de résistance aux insecticides (**Figure 26**) (Deshayes *et al.*, 2018).

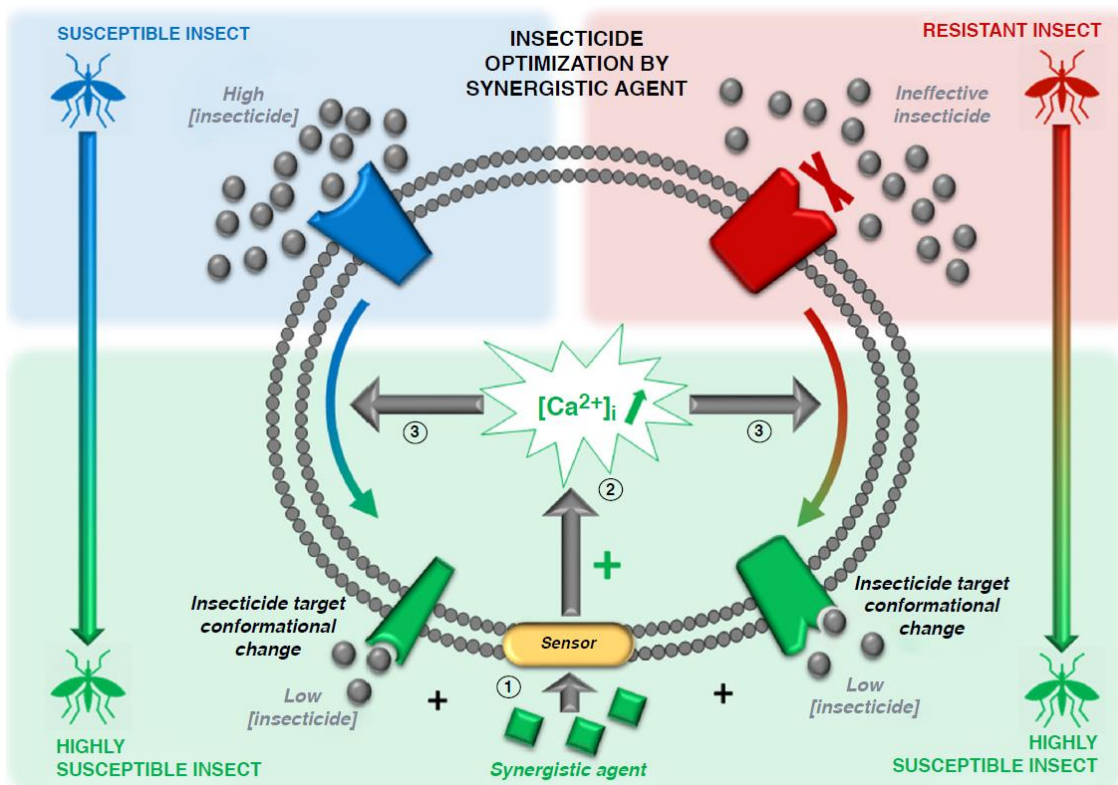


Figure 26 : Illustration de l'optimisation de l'effet des insecticides par l'utilisation d'un agent synergisant. Les boîtes bleues et rouges représentent respectivement les insectes sensibles et résistants. Les insecticides sont efficaces à forte concentration sur les insectes sensibles et peu efficaces sur les insectes résistants. La fixation de l'agent synergisant sur des récepteurs membranaires spécifiques (1) permet l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ) (2). L'activation d'effecteurs et de voies de signalisations dépendants du calcium induit le changement de conformation de la cible de l'insecticide (3). Cette dernière devient plus sensible à l'insecticide (Deshayes *et al.*, 2018).

## 1.2. L'importance du calcium intracellulaire dans la potentialisation de l'effet insecticide

Le calcium est un ion ubiquitaire très important dans un grand nombre de processus cellulaires, particulièrement dans les neurones où il est impliqué dans les processus de neurosécrétion, d'exocytose, d'excitabilité membranaire, d'apoptose, de synaptogénèse, de croissance et de différenciation neuronale en tant que messager secondaire (Südhof, 2004; Bollimuntha *et al.*, 2017; Prakriya, 2020). Le premier évènement qui sollicite les voies de signalisation calciques est une augmentation transitoire de la concentration en calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) dans le cytosol d'amplitude, de localisation et de durée variable.

La  $[Ca^{2+}]_i$  au repos est relativement basse (20-80nM), ce qui crée un gradient avec le compartiment extracellulaire où elle est de 1 à 5mM. Dans la cellule, il existe des stocks de calcium intracellulaires au sein de plusieurs organelles dont les principaux sont le réticulum endoplasmique (0,3-0,7mM), l'appareil de Golgi (0,13-0,25mM), le noyau et la mitochondrie qui servent à déclencher de grandes cascades de signalisation. Différents lysosomes, endosomes et autres vésicules servent aussi de petits stocks de calcium qui sont utilisés pour des régulations locales et précises d'évènements intracellulaires (**Figure 27**) (Yang *et al.*, 2019).



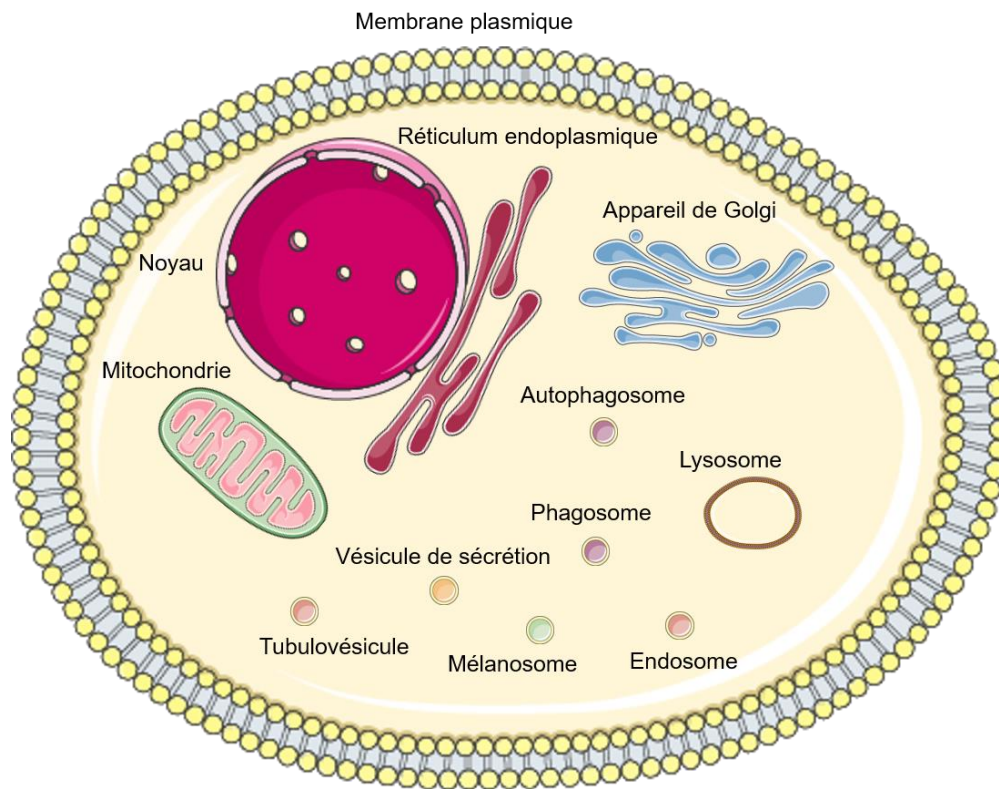


Figure 27 : Organelles impliquées dans le stockage intracellulaire du calcium (Modifié d'après Yang *et al.*, 2019).

Pendant une stimulation, l'activation de canaux calciques de la membrane plasmique ou de la membrane des organelles permet une élévation de calcium intracellulaire provenant du compartiment extracellulaire et/ou des stocks intracellulaires.

### Origine extracellulaire du calcium

Dans les neurones, l'entrée de calcium au travers de la membrane plasmique se fait par les récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChR), les récepteurs à l'acide *N*-methyl-d-aspartique (NMDAR), les canaux calciques dépendants du potentiel ( $Ca_v$ ) ou les canaux TRPC (« transient receptor potential type C channels») (Ryglewski *et al.*, 2007; Grienberger et Konnerth, 2012; Brini *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2019).

### Libération des stocks de calcium

L'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) ou de récepteurs tyrosine kinases (RTKs) induit l'activation de la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylglycérol (DAG). Le DAG est un second messenger localisé sur le feuillet interne de la membrane plasmique qui active la Protéine kinase C (PKC). L'IP<sub>3</sub> mobilise les stocks de calcium intracellulaire en se fixant sur son récepteur,



IP3R, au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Au niveau du réticulum endoplasmique, les récepteurs à la ryanodine sont des canaux qui participent aussi au relargage du calcium depuis les stocks intracellulaires lorsque le IP3R est activé (Sattelle *et al.*, 2008). L'ensemble de cette cascade aboutit à l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Ryglewski *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2019).

Chez l'insecte, l'élévation de calcium intracellulaire est le premier évènement moléculaire impliqué dans la potentialisation de l'effet insecticide par un agent synergisant (Lavialle-Defaix *et al.*, 2010; Abd-Ella *et al.*, 2015; Raymond *et al.*, 2017; Deshayes *et al.*, 2018; Pitti Caballero *et al.*, 2019; Moreau *et al.*, 2020). Le rôle d'un agent synergisant est donc d'induire une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  afin d'activer des voies de signalisation intracellulaire dépendantes du calcium qui sont impliquées dans la sensibilisation des cibles aux insecticides (**Figure 28**).

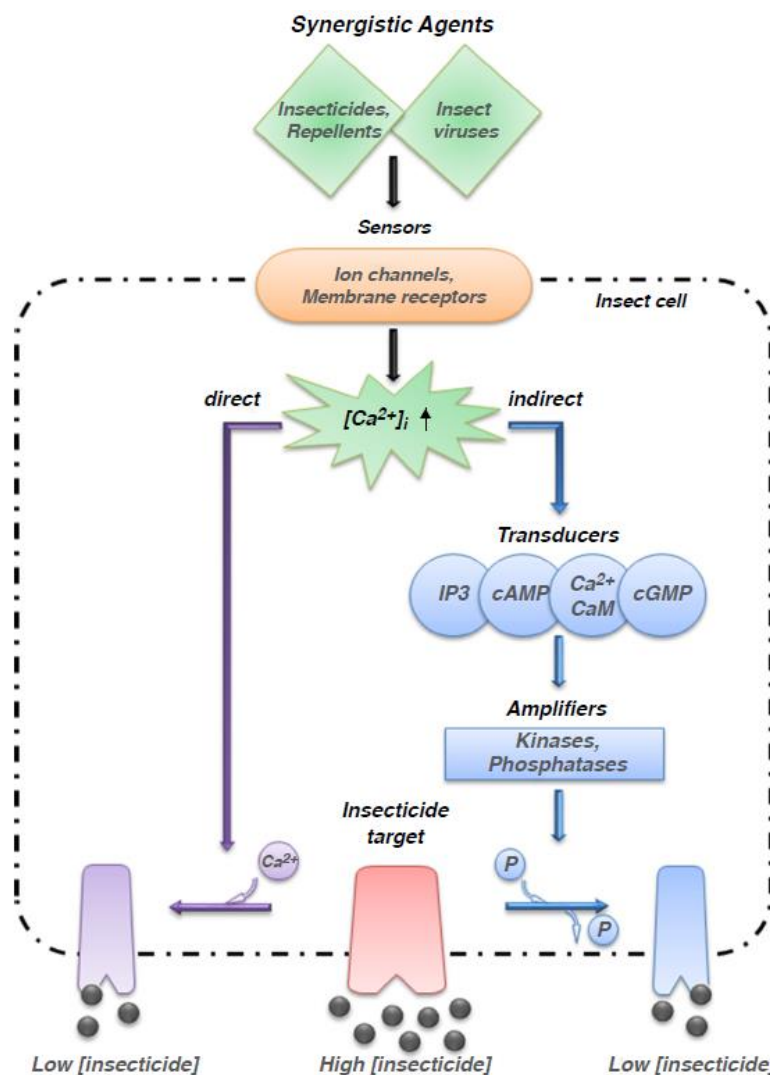


Figure 28 : Exemple de signalisations dépendantes du calcium recrutées par les agents synergisants chimiques et biologiques. La fixation de l'agent synergisant sur son récepteur (sensor) induit une élévation de calcium. Le calcium peut agir directement sur la cible de l'insecticide ou activer des seconds messages

(transducers), kinases et/ou phosphatases (amplifiers). Ces acteurs vont changer la conformation de la cible de membranaire de l'insecticide et potentialiser l'effet de ce dernier (Deshayes *et al.*, 2018).

### 1.3. La différence synergiste / agent synergisant

Il est important de différencier les synergistes classiquement utilisés dans les formulations des agents synergisants (Deshayes *et al.*, 2018).

Les synergistes sont des produits qui inhibent les enzymes de détoxication impliquées dans la dégradation de l'insecticide, celui-ci peut donc atteindre et agir sur sa cible au niveau neuronal (Young *et al.*, 2005; Sanei Dehkordi *et al.*, 2017). Le piperonyl butoxide (PBO) et le S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF) sont les deux synergistes les plus utilisés. Le PBO est responsable d'une inhibition des cytochromes P450 monooxygénases impliquées dans la dégradation des insecticides (Kweka *et al.*, 2017; Kongmee *et al.*, 2019). Lorsqu'on utilise un synergiste en association avec un insecticide sur une souche de moustique résistant aux insecticides, on ne parle pas de réelle synergie entre les deux molécules, mais plutôt d'une restauration de la sensibilité à l'insecticide qui peut être mesurée grâce à des bioessais homologués par l'OMS (OMS, 2005; OMS 2016). Les différences entre synergistes et agents synergisants sont résumées dans le **tableau 4**.

	Synergistes	Agents synergisants
Mode d'action	Inhibition de la détoxication de l'insecticide	Modification de la cible de l'insecticide par activation de voies de signalisation intracellulaires
Effet insecticide	100% de l'effet attendu à une dose donnée ( <b>restauration de l'effet de l'insecticide</b> )	>100% de l'effet attendu à une dose donnée ( <b>synergie</b> )
Exemples	PBO (Dadzie <i>et al.</i> , 2017) DEF (Sanei Dehkordi <i>et al.</i> , 2017)	DEET (Abd-Ella <i>et al.</i> , 2015) IR3535 (El-Adouzi <i>et al.</i> , 2020; Moreau <i>et al.</i> , 2020) Virus d'insectes (Lapied <i>et al.</i> , 2009; Licznar <i>et al.</i> , 2014; Apaire-Marchais <i>et al.</i> , 2016) Insecticides (Corbel <i>et al.</i> , 2003; Darriet et Chandre, 2013; Pitti Caballero <i>et al.</i> , 2019)

Tableau 4 : Caractéristiques des synergistes et des agents synergisants.

## 2. Les associations synergiques

Plusieurs stratégies d'associations synergiques ont été développées pour lutter contre les phénomènes de résistance. Dans ces études, peuvent être considérées comme des agents synergisants certains insecticides, répulsifs et virus capables d'induire une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

### 2.1. La combinaison de deux insecticides

Le mélange d'insecticides est un procédé étudié chez les vecteurs de maladies depuis le début des années 2000. Le principe est de combiner deux insecticides dont le mode d'action, voire la cible, sont différents afin d'obtenir un effet additif et dans l'idéal synergique que ce soit sur la mortalité ou l'effet anti-appétant. Raymond et ses collaborateurs ont fait un état des lieux de toutes les combinaisons d'insecticides utilisées dans le contrôle des insectes nuisibles (Raymond *et al.*, 2017). Quasiment toutes les combinaisons répertoriées comptent un pyréthrianoïde. La combinaison d'insecticides serait plus efficace que la rotation des formulations ou l'application en mosaïque. En effet, dans une population dans laquelle un mécanisme de résistance à un insecticide apparaît, il est peu probable que l'insecte soit simultanément résistant aux deux molécules, ainsi les insecticides utilisés en combinaison conservent leur efficacité car ils sont chacun utilisés à une dose létale pour l'insecte sensible (Roush, 1993). Une stratégie prometteuse est d'utiliser les insecticides à des doses sublétales pour induire un effet synergique.

#### **Pyréthrianoïde / Carbamate**

En 2003, Corbel et ses collaborateurs ont montré une synergie entre la perméthrine (pyréthrianoïde) et le propoxur (carbamate) chez les larves de *Culex quinquefasciatus* en comparant la mortalité attendue et la mortalité observée du mélange, cette dernière étant bien supérieure à la valeur attendue. Par exemple, à une concentration où la perméthrine seule et le propoxur seul induisent chacun 1% de mortalité, la mortalité attendue de la combinaison perméthrine + propoxur est de 2%, mais la mortalité observée est de 50% (Corbel *et al.*, 2003). L'hypothèse avancée pour expliquer la synergie est que les mécanismes de détoxification mis en place par l'insecte seraient saturés par la combinaison d'insecticides. Or, les insecticides sont souvent le substrat des mêmes enzymes. L'un des deux pourrait donc être principalement dégradé au profit de l'autre qui agirait « normalement ». Cependant dans l'étude suivante réalisée en 2006 sur neurones de blattes en présence de PBO ou de tribufos (insecticide OP) la synergie entre la perméthrine et le propoxur n'est pas affectée (Corbel *et al.*, 2006). Cela montre

que les insecticides peuvent avoir un effet synergique en agissant simultanément sur des cibles différentes. Dans cette même étude, Corbel et ses collaborateurs montrent que l'effet anti-acétylcholinestérasique des OP et CX provoquent une accumulation d'ACh dans l'espace synaptique. Le pyréthriinoïde utilisé dans le mélange, de son côté, bloque les canaux sodium dépendants du potentiel dans un état ouvert, causant une augmentation de la fréquence de décharge des potentiels d'action et donc une libération plus importante d'ACh au niveau synaptique. L'excès d'ACh dans la fente synaptique induit un feedback négatif sur la libération d'ACh par l'activation de récepteurs muscariniques présynaptiques de type M2.

### **Pyréthriinoïde / Phénylpyrazole**

Le fipronil, un insecticide phénylpyrazole utilisé pour contrôler les puces et les tiques sur les animaux de compagnie, a déjà été utilisé en combinaison avec la perméthrine, un pyréthriinoïde de type I contre des moustiques *C. pipiens*, *A. albopictus* et *A. aegypti*. L'efficacité du fipronil avait déjà été rapportée auparavant sur *C. pipiens* (Bouhsira *et al.*, 2009). La combinaison de la perméthrine avec le fipronil appliquée de manière topique une seule fois sur des chiens induit une activité répulsive et insecticide forte contre les trois espèces de moustiques. Cependant, l'activité insecticide est variable entre *C. pipiens* et les deux espèces d'*Aedes*. Cela pourrait être expliqué par des différences dans l'activité répulsive qui limiterait le temps de contact avec la formulation (Fankhauser *et al.*, 2015).

### **Pyréthriinoïde / Néonicotinoïde**

La deltaméthrine est un pyréthriinoïde de type II recommandé par l'OMS en LAV. Dans plusieurs études, cette molécule a été utilisée en association avec le PBO et un néonicotinoïde et une synergie potentialisatrice a été observée sur une souche d'*A. aegypti* résistante aux pyréthriinoïdes (Darriet et Chandre, 2011; Darriet et Chandre, 2013). Dans ces études, à une concentration pour laquelle le néonicotinoïde seul *in vivo* induit peu de mortalité, l'association avec la deltaméthrine permet d'augmenter significativement la mortalité induite par la deltaméthrine sur des souches de moustiques résistants aux pyréthriinoïdes (**Tableau 5**). Cependant, le mécanisme mis en œuvre était alors inconnu.

Souche	Insecticide ou synergiste	Mortalité attendue (%)	Mortalité observée (%)
Bora	Deltaméthrine		99%
LHP	Deltaméthrine + PBO + thiamethoxam	19	70,7
	Deltaméthrine + PBO + nitenpyram	19,4	64,9
	Deltaméthrine + PBO + thiaclopride	17,7	55,9
	Deltaméthrine + PBO + imidaclopride	17,7	34,3
	Deltaméthrine + PBO + clothianidine	18,5	32,9
	Deltaméthrine + PBO + acétamépride	19,7	28,9

Tableau 5 : Comparaison de l'effet de la deltaméthrine seule (9,2 mg/m<sup>2</sup>) et en combinaison avec du PBO (222mg/m<sup>2</sup>) et un néonicotinoïde (367mg/m<sup>2</sup>) sur une souche d'*A. aegypti* résistante aux pyréthriinoïdes (souche LHP). Il est important de noter que la deltaméthrine à cette concentration induit 99% de mortalité sur la souche sensible de référence d'*A. aegypti* (Bora) (Modifié d'après Darriet et Chandre, 2013).

La perméthrine et la dinotéfuran ont aussi été testés en association avec le pyriproxifène (inhibiteur de croissance) en application sur des chiens pour lutter contre *A. aegypti*. L'activité répulsive de cette combinaison s'est avérée plus longue que celle des combinaisons de perméthrine avec l'imidaclopride. L'activité insecticide est forte et se maintient dans le temps, avec une mortalité induite de 93% après 1h ou 24h de contact des moustiques avec la combinaison insecticide appliquée 28 jours plus tôt sur les chiens (Franc *et al.*, 2012).

### Pyréthriinoïde / Oxadiazine

La deltaméthrine a aussi été utilisée en tant qu'agent synergisant du DCJW, un métabolite actif de l'indoxacarbe (Pitti Caballero *et al.*, 2019). L'indoxacarbe est un insecticide de la classe des oxadiazines, des inhibiteurs des canaux sodium. Cela a pour effet d'empêcher la décharge des potentiels d'action au niveau neuronal. Dans cette étude Pitti Caballero et ses collaborateurs montrent que la deltaméthrine est capable d'induire une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  *in vitro* dans le Dorsal Unpaired Median (DUM) neuron de la blatte *P. americana*. Dans ce modèle, la deltaméthrine induit une entrée de sodium importante dans le neurone, ce qui a pour effet d'activer l'échangeur Na/Ca en mode inverse conduisant à une élévation de calcium intracellulaire. L'échangeur Na/Ca maintient normalement une concentration faible en calcium intracellulaire en échangeant un ion calcium interne contre trois ions sodium externes. En mode inverse, il est donc responsable d'une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  et permet une efficacité plus grande du DCJW (Lavialle-Defaix *et al.*, 2010) (**Figure 29**). Une synergie entre la deltaméthrine et le DCJW est alors observée.

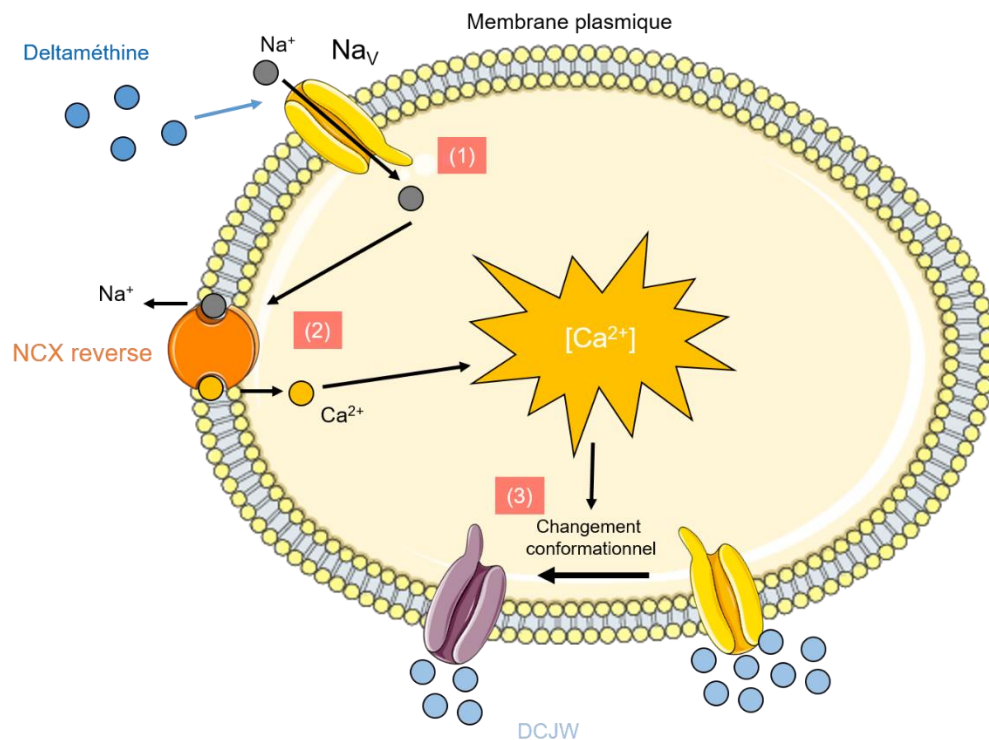


Figure 29 : Potentialisation de l'effet du DCJW par la deltaméthrine *in vitro*. (1) L'effet de la deltaméthrine sur le canal sodium dépendant du potentiel ( $Na_v$ ) entraîne une augmentation de la concentration en sodium intracellulaire ainsi qu'une dépolarisation membranaire. (2) Cela favorise le fonctionnement de l'échangeur Na/Ca en mode inverse (NCX reverse). (3) Il y a donc un influx calcique important qui augmente la sensibilité du canal  $Na_v$  pour de faibles concentrations de DCJW (Modifié d'après Pitti Caballero *et al.*, 2019).

Les mécanismes de synergie entre plusieurs insecticides sont donc extrêmement complexes et méritent d'être étudiés dans la mesure où le nombre de classes d'insecticides utilisables est limité. L'utilisation d'un mélange synergique de deux insecticides permet d'envisager une meilleure utilisation de ces produits en LAV.

## 2.2. La combinaison virus / insecticide

Des virus d'insectes comme les baculovirus et les densovirus peuvent également être utilisés comme des agents synergisants et non comme un biopesticide puisqu'il a été montré que l'entrée du virus dans une cellule d'insecte était corrélée à une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , caractéristique d'un agent synergisant, par un mécanisme encore inconnu (Licznar *et al.*, 2014; Apaire-Marchais *et al.*, 2016). Cependant, l'élévation de calcium est systématiquement bloquée

par l'utilisation de chlorure de cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ), un bloqueur inorganique de canaux calciques dépendants du potentiel, suggérant leur implication dans le phénomène.

### **Virus / Organophosphoré**

L'infection par le baculovirus *Autographa californica* permet la potentialisation de l'effet d'un insecticide OP, le chlorpyrifos-éthyl *via* cette élévation de calcium sur des cellules Sf9 exprimant l'ACHé d'*An. gambiae*. La sensibilité à l'insecticide est multipliée par 1,5 (Licznar *et al.*, 2014). Dans ce cas, le virus peut être considéré comme un agent synergisant biologique. L'effet de cet insecticide est aussi potentialisé *in vivo* sur des larves de stade 4 de *Spodoptera littura* par la combinaison avec un granulovirus spécifique (SplGV) de cet insecte avec 3 ratios de concentrations différents : 1) virus à la dose létale qui induit 25% de mortalité ( $\text{DL}_{25}$ ) + insecticide à la  $\text{DL}_{25}$ , 2) virus à la  $\text{DL}_{25}$  + insecticide  $\text{DL}_{50}$ , 3) virus à la  $\text{DL}_{50}$  + insecticide  $\text{DL}_{25}$  (Subramanian *et al.*, 2005).

### **Virus / Néonicotinoïde**

Il a aussi été montré *in vivo* que l'utilisation de SplGV à la  $\text{DL}_{50}$  ( $2.2 \times 10^6$  corps d'inclusions polyhédriques) permet la potentialisation de l'effet de néonicotinoïdes à doses sublétales (thiamethoxam à 50 ppm et l'imidaclopride à 1-7 ppm) sur des larves âgées de 5 jours de cet insecte. Par exemple, la mortalité de 50% induite par le virus seul passe à 88,3% lorsqu'il est associé avec l'imidaclopride à 7ppm (Thi *et al.*, 2002).

### 2.3. La combinaison répulsif / insecticide

Alors que les répulsifs sont utilisés depuis longtemps, leur potentiel dans la lutte anti-vectorielle n'a que peu été étudié. Dans un contexte de forte résistance aux insecticides, de nouvelles stratégies s'appuyant sur des combinaisons synergiques insecticides/répulsifs ont été proposées et ont montré des effets sur la mortalité très intéressants (Raymond *et al.*, 2017). Comme présenté dans la partie « effet atypique des répulsifs » (**cf. Introduction, chapitre 2, partie 1.2.3.**), des études ont démontré que l'exploitation des effets atypiques des répulsifs permet l'optimisation de l'efficacité des insecticides.

#### **DEET ou IR3535 / Pyréthrianoïde**

L'implémentation récente de moustiquaires imprégnées d'insecticides et de répulsifs à longue durée a permis d'augmenter significativement la protection prodiguée par les moustiquaires imprégnées avec un pyréthrianoïde contre des adultes *A. aegypti*. L'imprégnation de DEET et d'IR3535 est réalisée dans les fibres profondes et le pyréthrianoïde dans les fibres de surface de la moustiquaire. La combinaison de DEET avec de la perméthrine ou de l'étofenprox dans des moustiquaires multi-couches augmentent significativement l'effet insecticide du pyréthrianoïde. Dans ce cadre, l'IR3535 empêche la liaison correcte du pyréthrianoïde à la surface de la moustiquaire et n'est donc pas optimal dans la potentialisation de l'effet insecticide. Cependant, alors que les doses de perméthrine retrouvées sur la moustiquaire sont faibles lorsqu'elle est imprégnée d'IR3535 (8-11 mg/m<sup>2</sup> contre les 1000-2000 mg/m<sup>2</sup> attendus), un effet synergique est quand même observé et souligne un très grand potentiel de l'IR3535 dans les combinaisons avec des insecticides (Faulde et Nehring, 2012).

Les combinaisons DEET/pyréthrianoïdes microencapsulées pourraient aussi s'avérer intéressantes contre *A. albopictus*. Il a été montré que l'effet de la deltaméthrine sur la mortalité est potentialisé par la combinaison des deux molécules et la microencapsulation permet de prolonger l'efficacité des moustiquaires imprégnées après un plus grand nombre de lavages (Yao *et al.*, 2015).

#### **DEET / Carbamate ou organophosphoré**

Le DEET a été testé à dose subrépulsive (1%) en combinaison avec un CX (propoxur) à la DL<sub>30</sub>. Ces deux molécules utilisées ensemble ont un effet synergique très fort sur la mortalité des *A. aegypti* portant la résistance *kdr* (Pennetier *et al.*, 2005). Le même effet synergique a été retrouvé dans des combinaisons DEET ou KBR / OP (pyrimiphos methyl) testées en imprégnation de moustiquaires. Cette fois-ci, la synergie permet l'inhibition du gorgement chez *An. gambiae*



et la moustiquaire reste efficace plus de 2 mois (Pennetier *et al.*, 2007). Le DEET et le KBR permettent aussi une augmentation de l'exophilie, de l'inhibition de gorgement et de la mortalité quand ils sont utilisés en combinaison contre le moustique *An. gambiae* souche sensible et souches résistantes (résistances *ace-1<sup>R</sup>* et *kdr*) avec le pirimiphos-methyl, un OP (Pennetier *et al.*, 2009).

Le mécanisme par lequel le DEET agit au niveau cellulaire et moléculaire pour potentialiser l'effet des insecticides est resté inconnu pendant plusieurs années. Il a ensuite été montré qu'à faible concentration, le DEET est capable d'augmenter la sensibilité des acétylcholinestérases membranaires aux CX. Cela implique l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire dépendante du calcium *in vitro* dans des neurones de la blatte *P. americana* et *in vivo* sur des femelles moustiques *A. aegypti*. Le DEET est capable de potentialiser l'effet du propoxur, un insecticide CX anticholinestérasique en se fixant sur un site haute affinité du récepteur cholinergique de type muscarinique de sous-type M1/M3. Cette liaison est capable d'activer la voie de signalisation impliquant de nombreux acteurs cellulaires responsables de la modulation calcium-dépendante de l'activité acétylcholinestérasique optimisant l'effet du propoxur. A plus forte concentration, le DEET peut se fixer sur un site allostérique basse affinité inhibant la potentialisation de l'effet insecticide (**Figure 30**) (Abd-Ella *et al.*, 2015). L'interaction DEET/propoxur ainsi que leur synergie potentialisatrice serait dépendante de l'activité des cytochromes P450 monooxygénases, qui est régulée par le niveau de calcium intracellulaire (Han *et al.*, 2009; Alzogaray, 2016). L'étude de l'effet du DEET sur les enzymes de détoxification a permis de comprendre des études plus anciennes qui rapportaient déjà une synergie inattendue entre ce répulsif et le propoxur (Bonnet *et al.*, 2009; Pennetier *et al.*, 2007).

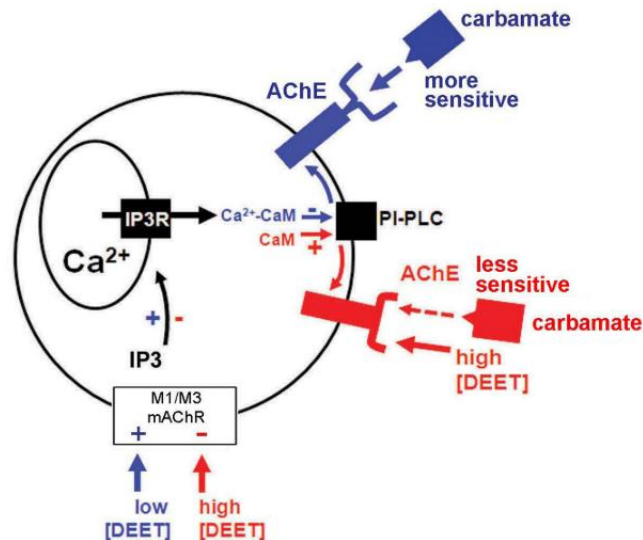


Figure 30 : Modèle proposé pour la potentialisation de l'effet d'un carbamate par le DEET par recrutement de voies de signalisation intracellulaire calcium-dépendantes dans les neurones d'insectes. Le DEET interagit avec les M1/M3 mAChR avec une haute affinité à basse concentration, causant l'activation de la PLC et la production d'IP3. L'IP3 en se fixant sur l'IP3R permet le relargage de calcium depuis les stocks intracellulaires de calcium, permettant la formation du complexe calcium-CaM et l'activation de la PI-PLC régulatrice de l'AChE. L'AChE devient alors plus sensible aux carbamates. AChE, acétylcholinestérase; CaM, calmoduline; PI-PLC, phosphatidylinositol (PI)-specific phospholipase C; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; IP3R, récepteur à l'IP3; mAChR, récepteur cholinergique de type muscarinique (Abd-Ella *et al.*, 2015).

### IR3535 / Néonicotinoïde

L'IR3535 présente moins d'effets secondaires connus et son activité insecticide reste très faible en comparaison avec celle du DEET (Pridgeon *et al.*, 2009; Alzogaray 2016). Cependant, il présente aussi des effets inattendus chez l'insecte grâce à son mode d'action complexe impliquant le site orthostérique et les sites allostériques du récepteur muscarinique de type M1. Chez la blatte *P. americana*, l'activation du site orthostérique M1 mAChR par l'IR3535 à faible concentration induit la dissociation de la protéine G associée au récepteur. Le complexe formé par les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  de cette protéine, une fois dissocié de la sous-unité  $\alpha$ , est capable d'inhiber des canaux potassiques de base. Cela résulte en une dépolarisation du neurone suffisante pour activer des canaux calciques dépendants du potentiel responsables d'une entrée de calcium (**Figure 31A, B ; phase 1**). La mobilisation du calcium permet ainsi d'activer des voies de signalisation intracellulaire calcium-dépendantes spécifiques (e.g., PKA, CaMKinase II) connues pour augmenter la sensibilité des cibles aux insecticides (Deshayes *et al.*, 2018; Raymond *et al.*, 2017). A plus forte concentration, l'IR3535 se fixe sur un site allostérique du M1 mAChR qui conditionne la protéine G dans un état assemblé et non dissocié, empêchant *in fine* l'entrée de calcium (**Figure 31A, B ; phase 2**). L'IR3535, au-delà de 100nM, induit une élévation

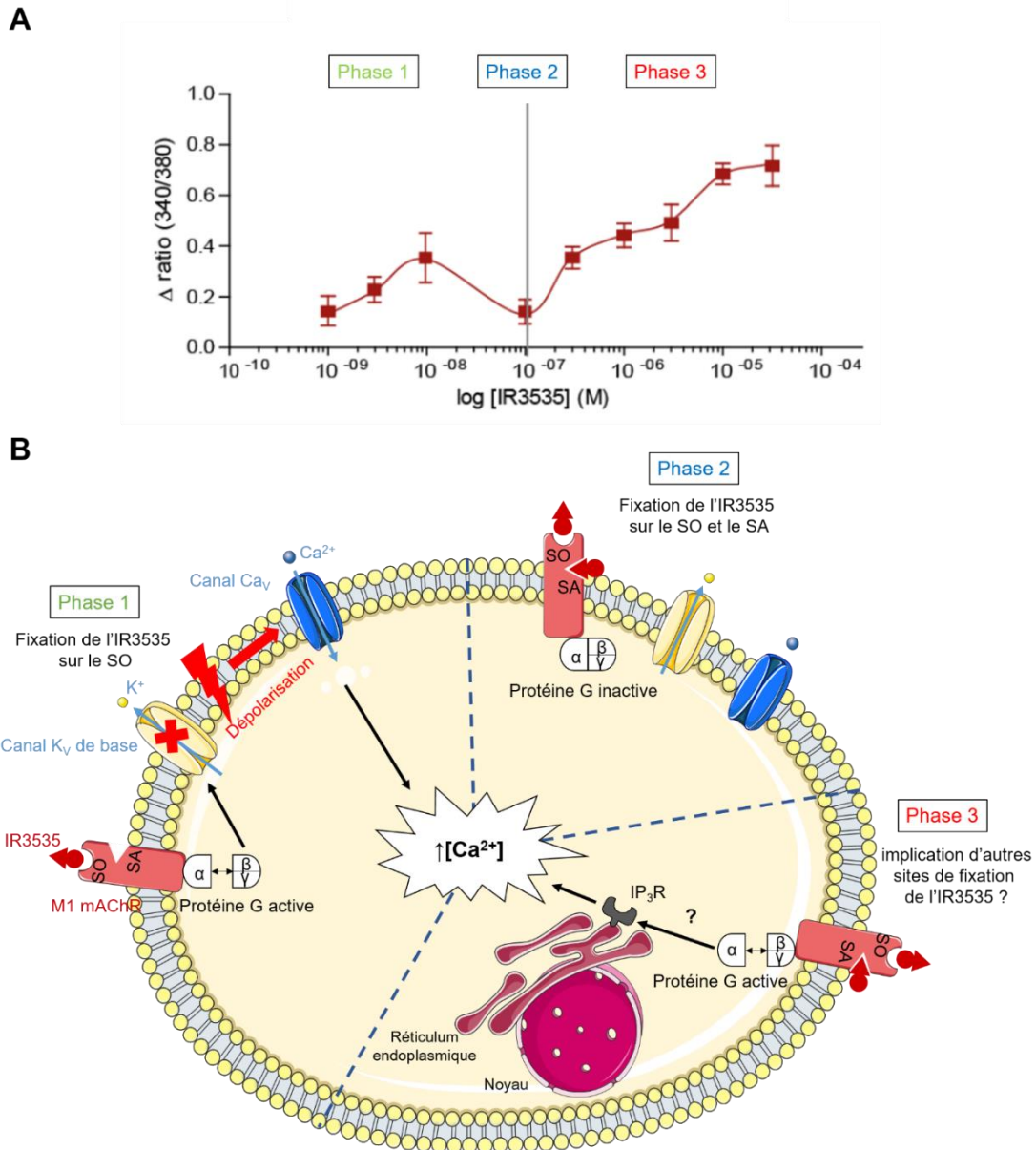


Figure 31 : Effet concentration-dépendant de l'IR3535 sur le M1 mAChR. A) Courbe effet log[IR3535] illustrant les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  mesurées en fonction de la concentration d'IR3535 utilisée sur les neurones DUM de la blatte *P. americana*. B) Schéma illustrant le mode d'action de l'IR3535. Phase 1 : L'IR3535 (10nM) se fixe sur le site orthostérique (SO) du récepteur muscarinique de type M1 (M1 mAChR), ce qui induit une dissociation de la protéine G. La sous-unité  $\beta\gamma$  inhibe les canaux potassiques ( $K_v$  de base) responsables du maintien du potentiel de membrane. Cela cause une dépolarisation qui active les canaux calciques dépendants du potentiel ( $Ca_v$ ) et augmente la  $[Ca^{2+}]_i$ . Phase 2 : L'IR3535 (100nM) se fixe aussi sur le site allostérique (SA) du M1 mAChR et favorise la reconstitution de la protéine G, il n'y a pas de dépolarisation et donc pas d'activation des canaux  $Ca_v$ . Phase 3 : L'IR3535 à plus forte concentration (>100nM) induit une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  par l'activation du récepteur à l'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) impliqué dans le relargage du calcium depuis les stocks intracellulaires, cet effet pourrait impliquer plus de site sur le M1 mAChR ou d'autres mécanismes physiologiques (Modifié d'après Goulu, 2015 et Moreau *et al.*, 2020).

de calcium par un relargage de celui-ci depuis le réticulum endoplasmique (**Figure 31A, B ; phase 3**). Il a été montré que l'IR3535 à faible concentration était capable de potentialiser l'effet du thiaclopride sur les neurones DUM de la blatte *P. americana* et *in vivo* sur *An. gambiae* (**Figure 32**) (El-Adouzi *et al.*, 2020; Moreau *et al.*, 2020). Ces données révèlent une nouvelle cible d'intérêt en LAV, le récepteur muscarinique, puisque l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par son activation influence l'effet des insecticides.

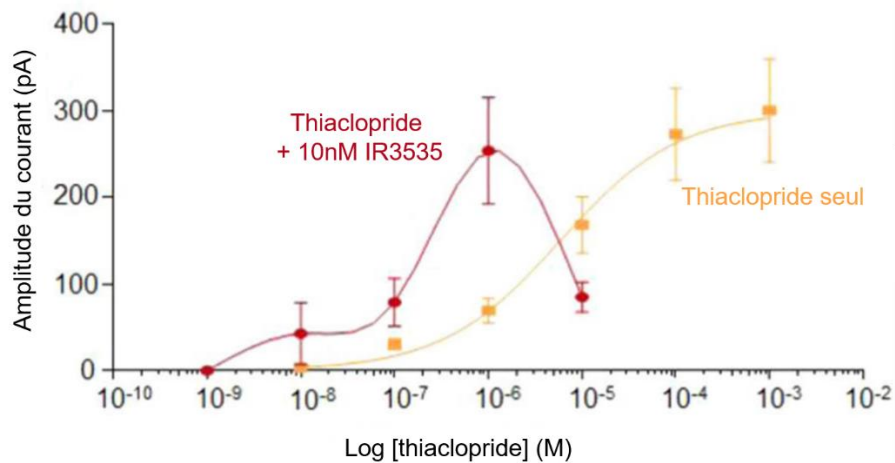


Figure 32 : Potentialisation de l'effet du thiaclopride par l'IR3535 à 10nM sur les DUM neurones de blattes *P. americana* (Moreau *et al.*, 2020).

Les répulsifs sont très intéressants en tant qu'agents synergisants car ce sont des molécules spécifiques de l'insecte qui, à des doses extrêmement faibles assurément sub-répulsives, potentialisent l'effet des insecticides *in vitro* et *in vivo*. De plus, comme ce ne sont pas des insecticides à faible concentration, la pression de sélection qu'ils engendrent est considérablement réduite.

## Chapitre 5 : Objectifs du travail de thèse

Dans ce contexte d'émergence et de diffusion des phénomènes de résistances qui entravent l'efficacité de la LAV, il est nécessaire de proposer de nouvelles stratégies permettant d'optimiser le traitement insecticide tout en diminuant les doses utilisées. Ce projet de thèse consiste donc à développer de nouvelles stratégies de lutte chimique par une approche complète multidisciplinaire allant des études *in vitro* à *in vivo* sur deux souches de moustiques *An. gambiae* résistantes aux insecticides, les souches AcerKis (résistance *ace-1<sup>R</sup>* aux OP et CX), et KdrKis (résistance *kdr* aux pyréthriinoïdes et au DDT). Les résultats obtenus sur ces deux souches de moustiques seront comparés aux résultats obtenus avec les mêmes expérimentations sur la souche sensible de référence, la souche Kisumu (Kis).

Dans un premier temps, il est primordial de déterminer s'il existe des mécanismes cellulaires et moléculaires associés aux mutations *ace-1<sup>R</sup>* et *kdr* qui pourraient influencer l'effet des insecticides sur leur cible *in vitro* puis *in vivo*. Dans un deuxième temps et en s'appuyant sur cette première étude fondamentale, l'objectif est de développer et d'adapter une stratégie de protection en utilisant une association de deux composés de familles chimiques différentes, à savoir un répulsif (IR3535) et un insecticide néonicotinoïde (clothianidine, agoniste) ou mésoionique (triflumézopyrime, antagoniste) qui agissent spécifiquement sur des récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChR) (Casida et Durkin, 2013; Holyoke *et al.*, 2017).

Le choix de la famille d'insecticides à tester, en particulier les néonicotinoïdes fait suite aux rapports d'expertise collective publiés par l'Anses en 2013 et 2016 (Anses, 2016). Dans ces rapports, les différentes conclusions indiquent que les néonicotinoïdes constituent une famille d'insecticides d'intérêt en LAV. Concernant l'insecticide mésoionique, ce sera la première fois que ce type de molécule est testé dans le cadre de la LAV. De plus, ces deux insecticides ont été identifiés comme étant particulièrement intéressants dans la lutte contre *An. gambiae* parmi une grande sélection de molécules à effet insecticide (Lees *et al.*, 2019). Enfin, des études menées au laboratoire ont montré que l'efficacité des néonicotinoïdes sur les nAChRs dépend du calcium intracellulaire (Bodereau-Dubois *et al.*, 2012). Par conséquent, ces néonicotinoïdes et l'insecticide mésoionique qui ne sont pas utilisés directement contre les moustiques semblent particulièrement intéressants puisqu'il n'existe *a priori* pas de résistances avérées contre ces substances actives. Enfin l'utilisation d'un insecticide mésoionique, jamais utilisé en LAV, permet de disposer d'une alternative importante pour éviter les problèmes de résistances croisées.

Le choix du répulsif quant à lui se porte vers l'IR3535. Nous détournons cette molécule de son utilisation première en tant que répulsif afin d'exploiter ses effets atypiques sur les mAChRs pour potentialiser l'effet des insecticides néonicotinoïdes et mésoioniques grâce à une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  (El-Adouzi *et al.*, 2020; Moreau *et al.*, 2020). De plus, contrairement au DEET, considéré comme un répulsif et agent synergisant de choix, l'IR3535 ne présente pas d'effets secondaires inattendus qui rendent son utilisation en tant qu'agent synergisant risquée.

L'efficacité des insecticides et de l'IR3535 seuls et en combinaison sera testée *in vitro* par la technique électrophysiologique du patch-clamp et de l'imagerie calcique sur les neurones isolés des moustiques Kis, AcerKis et KdrKis (Lavialle-Defaix *et al.*, 2011). Enfin, l'efficacité des associations clothianidine/IR3535 et triflumézopyrime/IR3535 sera testée *in vivo* grâce à des tests larvaires homologués par l'OMS (OMS, 2005)

# Matériels et méthodes

## Chapitre 1 : Modèle biologique : *Anopheles gambiae s.s.*, souches sensibles et résistantes

### 1. Souches de moustique

Dans cette étude, trois souches de moustiques *Anopheles gambiae s.s.* sont utilisées : Kisumu (Kis), AcerKis et KdrKis.

#### **Souche Kisumu « Kis »**

Cette souche est la souche de référence sensible aux insecticides (Shute, 1956). Isolée à partir de collection sur le terrain dans la ville de Kisumu au Kenya en 1975, elle ne présente aucune mutation ni mécanisme de résistance aux insecticides.

#### **Souche AcerKis**

La souche AcerKis est résistante aux insecticides organophosphorés et aux carbamates grâce à la mutation G119S (résistance *ace-1<sup>R</sup>*) sur l'acétylcholinestérase (**cf. Introduction, chapitre 3, partie 1.2.**). De la même manière, cette souche est obtenue par introgression de l'allèle *ace-1<sup>G119S</sup>* dans la souche Kisumu par une quinzaine de croisements répétés (Alout et al., 2013). Les individus résistants sont sélectionnés à l'aide du propoxur. L'allèle *ace-1<sup>G119S</sup>* a été obtenu par des collections d'individus résistants aux organophosphorés/carbamates au Burkina Faso en 2002 (Djogbénou et al. 2010).

#### **Souche KdrKis**

La souche KdrKis est résistante aux insecticides pyréthrinoïdes et au DDT grâce à la mutation homozygote L1014F (résistance knock-down ; *kdr*) sur le canal sodium dépendant du potentiel (**cf. Introduction, chapitre 3, partie 1.2.**). Cette souche est obtenue par introgression de l'allèle *kdr-west* (L1014F) dans la souche Kisumu par une quinzaine de croisements répétés (Alout et al., 2013). Les individus résistants sont sélectionnés à l'aide de perméthrine. L'allèle *kdr-west* a été obtenu par des collections d'individus résistants aux pyréthrinoïdes au Burkina Faso en 1998 (Martinez-Torres et al., 1998).

### **Contrôle des souches**

Le génotype des trois souches de moustiques est contrôlé au laboratoire MIVEGEC tous les 3 mois à l'aide de qPCR avec des sondes Taqman ciblées sur les mutations *kdr* et *Ace-1<sup>R</sup>*. Ces tests confirment la présence homozygote de ces allèles de résistance.

## **2. Elevage des moustiques**

Les moustiques utilisés dans cette étude sont élevés au sein du laboratoire SiFCIR à Angers et au laboratoire MIVEGEC à Montpellier.

### **Conditions d'élevage des moustiques au laboratoire SiFCIR**

Pour les tests *in vitro* réalisés au laboratoire SiFCIR, les pontes ont été fournies par le laboratoire MIVEGEC de Montpellier. L'éclosion des pontes est réalisée dans une enceinte Sanyo® (28°C ; 80% d'humidité ; cycle photopériodique de 12h:12h). Dès leur réception, les pontes sont mises en eau déminéralisée dans des bacs de plastique de 3L. Après éclosion, les larves sont nourries avec de la nourriture pour poissons (TetraMin®) broyée. Au stade de nymphe, les bacs sont placés sous moustiquaire afin de récupérer les adultes. Une fois les moustiques devenus adultes, ceux-ci sont transférés dans des cages de 15x15x15cm ou 25x25x25cm et nourris grâce à un coton imbibé d'une solution de miel à 10% dilué dans de l'eau osmosée. Les cages d'adultes sont disposées dans l'enceinte Sanyo®. Le gorgement des femelles de la souche Kisumu est réalisé deux fois par semaine sur membrane grâce à un appareil Hemotech qui comprend une cellule à gorgement contenant du sang humain chauffé à 37°C. Les femelles des souches résistantes ne sont pas gorgées et sont utilisées uniquement pour les expériences.

### **Conditions d'élevage des moustiques au laboratoire MIVEGEC**

Pour les tests *in vivo* réalisés au laboratoire MIVEGEC, le protocole d'élevage des moustiques est très similaire (27 ± 1°C ; 70 ± 10% d'humidité). Les cages d'adultes sont disposées dans une enceinte Memmert®. Le gorgement des femelles (souches sensible et résistantes) est réalisé deux fois par semaine avec du sang de lapin en cellule Hemotech ou directement sur oreille de lapin en contention.



## Chapitre 2 : Techniques utilisées *in vitro* sur neurones isolés de moustiques sensibles et résistants

### 1. Caractéristiques des neurones isolés de moustiques

Plusieurs modèles de culture de neurones primaires provenant de différentes espèces d'insectes ont été développés (Beadle, 2006). Ces cellules nerveuses expriment des canaux ioniques et récepteurs ciblés par les insecticides et constituent donc un modèle d'étude idéal pour investiguer le mode d'action des molécules qui agissent au niveau neuronal comme les insecticides et les répulsifs (Grolleau et Lapied, 2000; Wicher *et al.*, 2001).

Le modèle neuronal issu des moustiques *An. gambiae* souche Kis a été développé au laboratoire SiFCIR pour étudier l'effet des insecticides (Lavialle-Defaix *et al.*, 2011). Il est parfaitement adapté pour les techniques électrophysiologiques, d'imagerie calcique et de biologie moléculaire utilisées dans ce travail de thèse. L'étude de Lavialle-Defaix et collaborateurs en 2011 a permis d'identifier les neurones isolés des têtes de moustiques adultes (**cf. Matériels et méthodes, chapitre 2, partie 2.**) grâce à un double marquage immunocytochimique utilisant de l'acridine orange qui cible l'ADN du noyau ainsi que la protéine anti-péroxydase de raifort (HRP) pour marquer la surface neuronale. Ce double marquage permet la distinction des cellules neuronales et non-neuronales (Loesel *et al.*, 2006; Lavialle-Defaix *et al.*, 2011). Ce modèle neuronal exprime notamment différents canaux ioniques, protéines et récepteurs fonctionnels importants pour l'étude du mode d'action des insecticides (**Tableau 6**) :

Cibles membranaires	Sous-unité amplifiée
Canal sodium dépendant du potentiel (Nav)	Sous-unité $\alpha$ (AgNav1)
Canal calcium dépendant du potentiel (Cav)	Sous-unité $\alpha$ appartenant à la famille des canaux calcique à haut seuil d'activation (AgCav1)
Canal potassium dépendant du potentiel (Kv)	Sous-unité $\alpha$ du canal K <sup>+</sup> appartenant à la famille Shaker (Kv1)
Acétylcholinestérase 1	AChE1
Récepteur cholinergique de type nicotinique	Sous-unité $\alpha 1$ (Aga1 nAChR)

Tableau 6 : Cibles membranaires d'insecticides exprimés par les neurones isolés de moustiques *An. gambiae* (Lavialle-Defaix *et al.*, 2011).

## 2. Technique de dissociation des neurones de moustiques

Les expériences d'électrophysiologie, d'imagerie calcique et de biologie moléculaire sont réalisées sur des neurones isolés à partir des têtes de moustiques femelles adultes (*An. gambiae*) émergents le jour même des souches Kis et résistantes aux insecticides (Lavialle-Defaix *et al.*, 2011). Les moustiques sont endormis à 4°C en 10 minutes puis disposés sur la face dorsale sous loupe binoculaire pour pouvoir retirer les pièces buccales et couper les têtes. Ces dernières sont ensuite placées dans un milieu de survie (**Tableau 7**).

<b>Composés (mM)</b>	<b>Milieu de survie</b>
<i>NaCl</i>	130
<i>KCl</i>	2.5
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	5
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	3
<i>HEPES</i>	5
<i>Sucrose</i>	50
<i>Sérum de veau foetal (SVF) (%)</i>	5
<i>Streptomycine (mg/mL) / Pénicilline (UI/mL)</i>	50 / 50
	pH ajusté à 7,2 avec NaOH

Tableau 7 : Composition du milieu de survie utilisé pour la dissociation neuronale.

Pour obtenir les corps cellulaires des neurones isolés, les têtes sont soumises à une dissociation mécanique grâce à des aspirations/refoulements successifs à l'aide de pipettes Pasteur dont le diamètre de la pointe est diminué et poli à la flamme. Pour les expériences de patch-clamp, la suspension cellulaire est ensuite déposée dans des boîtes de Pétri dont le fond a été préalablement traité à la Poly-D-Lysine pour faciliter l'adhésion des neurones. Pour les expériences d'imagerie calcique, la suspension cellulaire est déposée sur lame de verre borosilicaté préalablement traitée à la Poly-D-Lysine. Avant l'utilisation de ces techniques, les neurones isolés sont maintenus à 29°C pendant 4h (**Figure 33**).

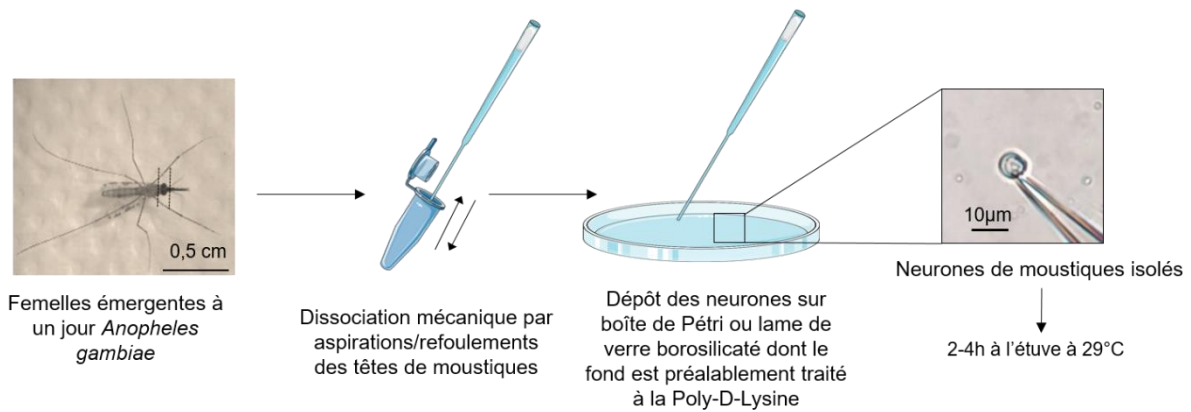


Figure 33 : Protocole de dissociation mécanique des têtes de moustiques pour obtenir les corps cellulaires des neurones isolés.

### 3. Technique électrophysiologique du patch-clamp

#### 3.1. Principe de la technique

L'activité électrique des neurones isolés de moustiques est étudiée grâce à la technique électrophysiologique du patch-clamp. Cette technique a été inventée dans les années 1970 puis améliorée en 1981 dans le but de comprendre le fonctionnement des canaux ioniques exprimés à la surface des cellules (Hamill et al., 1981). Une pipette de verre borosilicatée est appliquée contre la membrane du neurone. Une légère pression négative exercée à l'intérieur de la pipette de patch permet d'isoler électriquement une portion de membrane. En fonction de la configuration, les canaux ioniques et récepteurs se trouvant sur le neurone peuvent alors être modulés électriquement ou chimiquement pour en étudier les propriétés électrophysiologiques et fonctionnelles (Kornreich, 2007; Rubaiy, 2017).

Plusieurs configurations de patch-clamp peuvent être utilisées selon le but des expériences réalisées (**Figure 34**) :

- La **configuration cellule attachée** : La membrane plasmique n'est pas rompue, ce qui permet d'éviter de diluer les composants du cytoplasme avec la solution intrapipette. Par contre, cela rend le compartiment intracellulaire inaccessible. Cette configuration est utilisée pour étudier les conductances unitaires des canaux ioniques et récepteurs dont l'activité optimale est très dépendante de la concentration des composants intracellulaires.
- La **configuration cellule entière** : Cette configuration est obtenue par l'application successive de deux pressions négatives pour coller le neurone (seal) à la pointe de la pipette et causer une rupture de la membrane plasmique. Une continuité entre le cytoplasme, la pipette et le dispositif d'enregistrement est alors établie. Il est alors possible d'injecter des agents pharmacologiques dans le cytoplasme ou de modifier les concentrations des composants du cytoplasme. L'obtention d'un seal de l'ordre du  $G\Omega$  permet d'isoler électriquement la portion de membrane sous la pointe de la pipette et ainsi d'augmenter le rapport signal/bruit de fond. A partir de cette configuration, deux techniques sont utilisées, le potentiel ou le courant imposé. La technique du potentiel imposé permet de contraindre le potentiel à une valeur fixe et de mesurer des courants ioniques. La technique du courant imposé permet de suivre l'évolution du potentiel de membrane.
- La **configuration « inside-out »** : Pour atteindre cette configuration, la pipette est rétractée brutalement pour arracher une petite portion de membrane à partir de la configuration cellule attachée. Le seal est maintenu et le feuillet interne de la membrane est alors accessible par le bain et peut donc être modifié à l'aide de composés pharmacologiques. Cette configuration permet l'étude de l'effet de facteurs cytosoliques sur les canaux ioniques mais présente le désavantage de perdre tous les constituants intracellulaires qui peuvent être indispensables au fonctionnement des canaux.
- La **configuration « outside-out »** : Après être passé par la configuration cellule entière, la pipette est alors reculée lentement pour causer une rupture de la membrane. Une vésicule est alors formée au bout de la pipette de patch par reconstitution d'une petite portion de membrane. Le feuillet externe de la membrane est alors accessible par le bain et peut donc être modifié à l'aide de composés pharmacologiques. Cette configuration permet l'étude de l'effet de facteurs extracellulaires sur de petites populations de canaux ioniques mais présente le désavantage d'être très compliquée à établir.

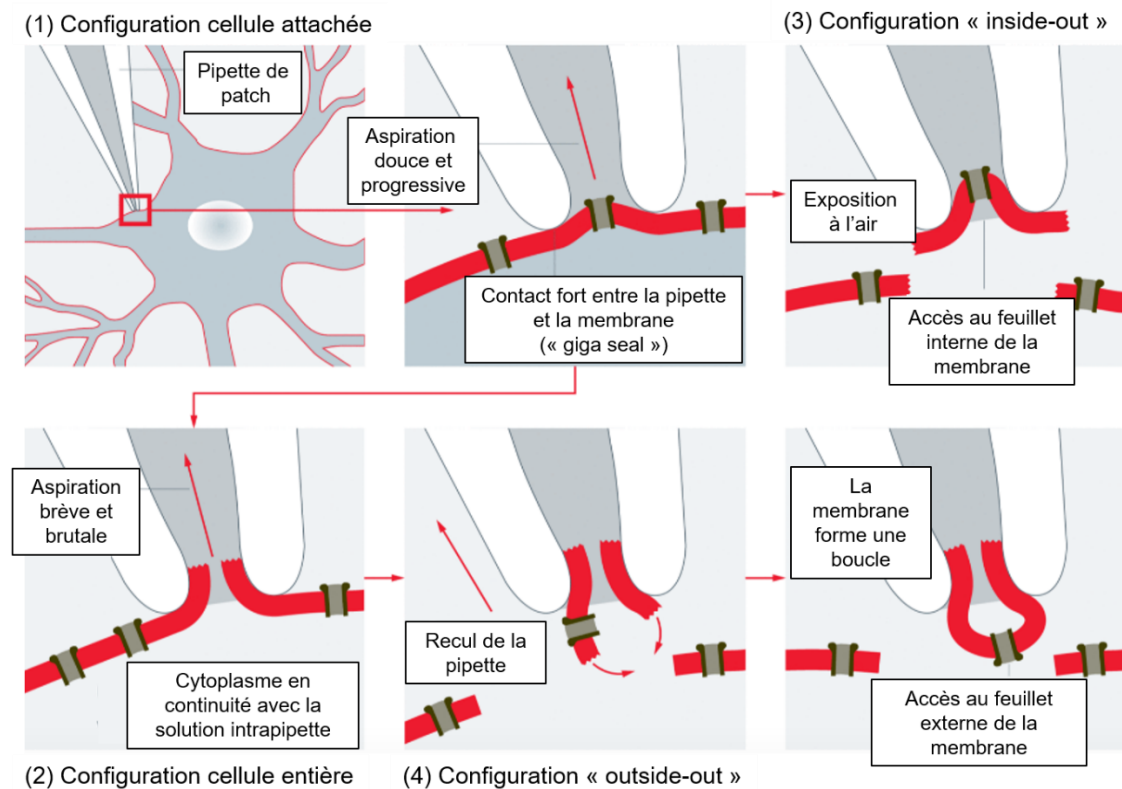


Figure 34 : Schéma représentatif des différentes configurations possibles avec la technique du patch-clamp (Modifié d'après leica-microsystems.com, 2011).

La technique du patch-clamp a d'abord été développée pour mener des études sur neurones de mammifères puis a rapidement été adaptée sur préparations neuronales d'insectes comme la blatte, le criquet, l'abeille, la drosophile, les papillons (Lapied *et al.*, 1989; Inoue *et al.*, 2014; Lavalie-Defaix *et al.*, 2015; Frolov *et al.*, 2016; Thompson *et al.*, 2020). Cette technique est par exemple utilisée pour étudier les propriétés électrophysiologiques et fonctionnelles ainsi que les mécanismes de régulation de l'activité des canaux ioniques (Wicher *et al.*, 2001; Thany *et al.*, 2008; Bodereau-Dubois *et al.*, 2012; List *et al.*, 2014; Mannai *et al.*, 2016) ainsi que l'effet d'insecticides et répulsifs (Abd-Ella *et al.*, 2015; Pitti Caballero *et al.*, 2019; Moreau *et al.*, 2020). Alors que la technique du patch-clamp a été adaptée en 2011 sur les neurones isolés de moustiques *An. gambiae*, aucune étude n'a jusqu'alors été menée concernant l'effet des insecticides sur cette préparation, encore moins sur des neurones isolés de souches résistantes aux pyréthrinoïdes ou aux organophosphorés et carbamates (Lavalie-Defaix *et al.*, 2011). La configuration cellule entière est utilisée dans cette étude pour enregistrer les courants ioniques (technique du potentiel imposé) et variations de potentiel membranaire (technique du

courant imposé) résultant de l'activation des nAChRs et/ou canaux ioniques membranaires sur des neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.

### 3.2. Dispositif d'enregistrement

Les pipettes de patch sont étirées à partir d'un capillaire de verre borosilicaté grâce à une étireuse Sutter P-97. Ces dernières sont fixées sur un porte-pipette mobile contrôlé à l'aide d'un micro-manipulateur piézo-électrique tridimensionnel (Sutter Instrument ROE-200, Novato, Etats-Unis) permettant des mouvements d'une amplitude inférieure au micromètre afin d'approcher délicatement la pipette de patch du corps cellulaire du neurone isolé de moustique. Lorsque la pipette est plongée dans le bain contenant les neurones, le potentiel de jonction est compensé avant d'établir la configuration cellule attachée. Une aspiration brève et brutale permet la rupture de la membrane plasmique et l'établissement de la configuration cellule entière. Les courants sont enregistrés grâce à un amplificateur Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, Etats-Unis) et les signaux sont filtrés grâce à un filtre passe-bas à 5KHz.

Le dispositif d'enregistrement comporte un amplificateur opérationnel (AOP) qui mesure la tension à chacune de ses bornes (borne 1 : potentiel pipette ( $V_{pip}$ ), borne 2 : potentiel imposé par l'expérimentateur ( $V_{cmd}$ )) et s'il y a une différence, il envoie un courant dans la boucle de contre-réaction (RCR) pour forcer le potentiel de pipette et de membrane à suivre le potentiel imposé par l'expérimentateur. Quand la différence est nulle, le courant passe à travers d'un amplificateur différentiel (AD) qui agit comme un convertisseur courant-tension qui compare le signal provenant de la pipette et le potentiel imposé par l'expérimentateur pour traduire la forme réelle du signal électrophysiologique (**Figure 35**).

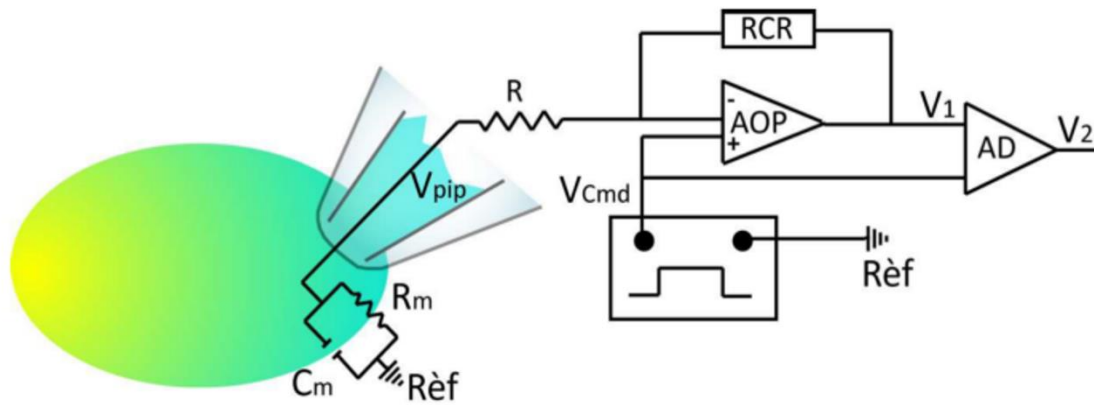


Figure 35 : Fonctionnement de l'amplificateur de patch. AOP : amplificateur opérationnel ; RCR : boucle de contre-réaction ; AD : amplificateur différentiel ;  $V_{pip}$  : potentiel de pipette ;  $V_{cmd}$  : potentiel imposé par l'expérimentateur (Goulu, 2015).

Les signaux analogiques (courants ioniques) sont envoyés dans une interface Digidata 1440A pour être convertis en signal numérique (Axon Instruments, Foster City, Etats-Unis) et être analysés à l'aide du logiciel pClamp (version 10.0, Axon Instruments, Foster City, Etats-Unis) (**Figure 36**). Les données sont représentées graphiquement puis exprimées statistiquement par l'utilisation de tests  $t$  paramétriques (Student) ou non-paramétriques (Mann-Whitney) grâce au logiciel GraphPad Prism version 8. Les données sont exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M..

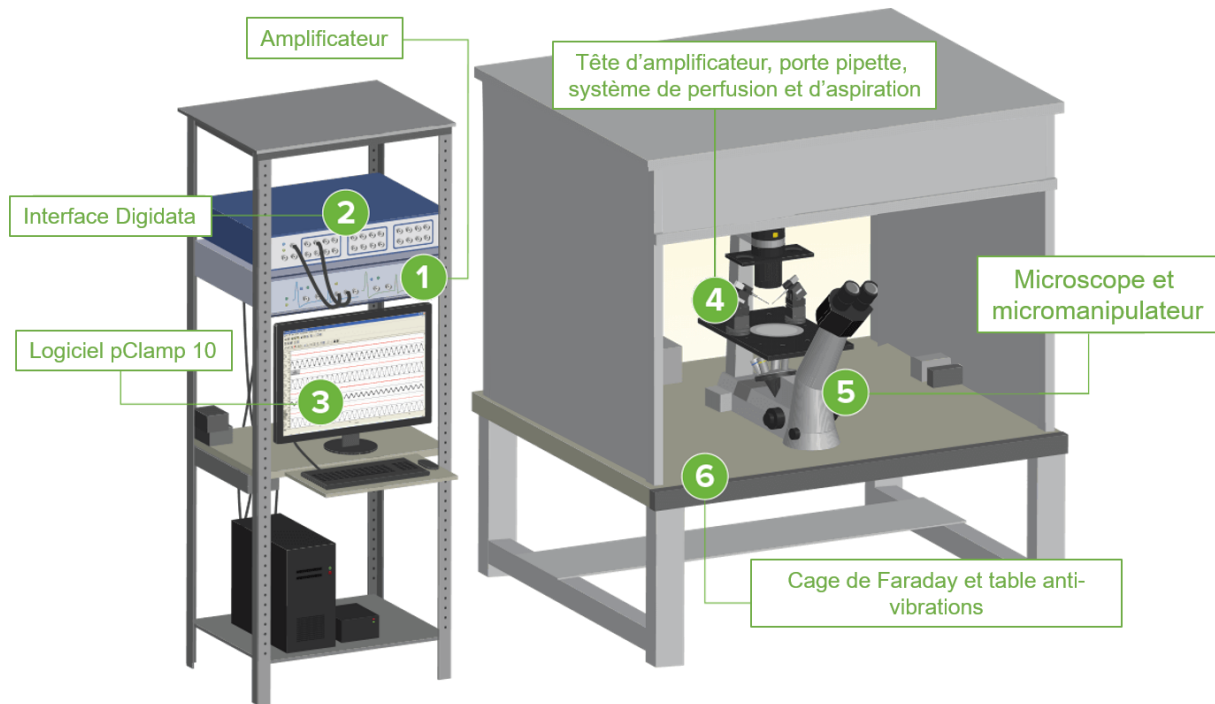


Figure 36 : Représentation schématique de l'installation d'un poste de patch-clamp. (1) L'amplificateur mesure la différence de potentiel entre la pipette de patch et l'électrode de référence dans le bain. Il permet d'imposer une tension ou un courant à la cellule et de mesurer courants et changements de potentiel membranaires. (2) L'interface, ou numériseur, acquiert les données analogiques et les convertit en signaux numériques. (3) Le logiciel pClamp10 permet l'acquisition, l'analyse des données électrophysiologiques, et le contrôle de l'amplificateur et de l'interface. (4) La tête d'amplificateur relie la pipette de patch à l'amplificateur pour permettre d'imposer des courants ou tensions à la cellule patchée. Les systèmes de perfusion et d'aspiration permettent de contrôler le milieu extracellulaire entourant le corps cellulaire des neurones. (5) Le microscope permet de faire la mise au point sur le corps cellulaire des neurones (grossissement x400) afin de faciliter l'approche de la pipette de patch grâce au micromanipulateur tridimensionnel. (6) La cage de Faraday est faite d'un alliage d'aluminium et de cuivre (Dural) qui entoure le poste de patch-clamp qui permet d'éviter les interférences électriques extérieures. La table anti-vibration empêche les perturbations d'alignement de la pipette (MolecularDevices.com, 2021).

### 3.3. Conditions expérimentales en potentiel imposé

La technique du potentiel imposé est utilisée pour étudier les variations de courants ioniques membranaires. Les courants autres que le courant étudié sont bloqués à l'aide d'agents pharmacologiques spécifiques (Lavialle-Defaix et al., 2011; Perrier et al., 2021). Les paragraphes suivants décrivent les conditions expérimentales dans lesquelles nous nous sommes placés en fonction du courant d'intérêt. La composition complète des solutions intrapipettes et extracellulaires utilisées dans chaque condition est donnée dans la partie suivante.



### **Conditions expérimentales pour l'enregistrement des courants induits par les agonistes cholinergiques en potentiel imposé.**

Le potentiel de membrane des neurones isolés de moustiques est maintenu à -50mV dans les expériences de potentiel imposé. Les pipettes de patch sont étirées de manière à obtenir une résistance de pipette de 6-9M $\Omega$  après remplissage avec la solution intrapipette. L'ACh est diluée extemporanément dans la solution extracellulaire et est appliquée pendant 3s sur les neurones isolés de moustiques dans les expériences réalisées en potentiel imposé. Comme l'ACh agit sur les nAChRs et sur les mAChRs, les expériences sont réalisées en présence d'atropine (100 nM) qui est un antagoniste spécifique des mAChRs (Lü *et al.*, 2020). Les insecticides néonicotinoïdes et mésoioniques sont dilués dans le DMSO puis dilués en cascade dans la solution extracellulaire pour obtenir la concentration désirée à perfuser sur les corps cellulaires des neurones. Ces solutions sont conservées hermétiquement moins de deux semaines à température ambiante à l'abri de la lumière.

Pour le détail de la composition des solutions intrapipettes et extracellulaires utilisées pour mesurer les courants induit par les agonistes cholinergiques, voir le **tableau 8, colonne 1** et le **tableau 9, colonne 1**, respectivement.

Pour le détail de la composition de la solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium voir le **tableau 8, colonne 2**.

### **Conditions expérimentales pour l'enregistrement des courants issus de l'activation des canaux calciques dépendants du potentiel en potentiel imposé**

Les pipettes de patch sont étirées de manière à obtenir une résistance de pipette de 4-6M $\Omega$  après remplissage avec la solution intrapipette. Le potentiel de membrane des neurones isolés de moustiques est maintenu à -50mV, puis plusieurs chocs dépolarisants de 10mV d'une durée de 10ms à une fréquence de 0,1Hz sont appliqués pour atteindre un potentiel de 0mV. Les courants de fuite et capacitifs sont compensés par l'utilisation d'un protocole P/4 grâce au logiciel pClamp 10.

Pour le détail de la composition des solutions intrapipettes et extracellulaires utilisées pour mesurer les courants issus de l'activation de canaux calciques dépendants du potentiel, voir le **tableau 8, colonne 2** et le **tableau 9, colonne 3**, respectivement.

### **Conditions expérimentales pour l'enregistrement des courants sodiques issus de l'activation des canaux sodiques dépendants du potentiel en potentiel imposé**

Les pipettes de patch sont étirées de manière à obtenir une résistance de pipette de 5-7M $\Omega$  après remplissage avec la solution intrapipette. Le potentiel de membrane des neurones

isolés de moustiques Kis et KdrKis est maintenu à -90mV puis des chocs dépolarisants de 10mV d'une durée de 4ms à une fréquence de 0,5Hz sont appliqués pour atteindre un potentiel de 20mV. Les courants de fuite et capacitifs sont compensés par l'utilisation d'un protocole P/6 grâce au logiciel pClamp 10.

Pour le détail de la composition des solutions intrapipettes et intracellulaires utilisées pour mesurer les courants induits par les agonistes cholinergiques, voir le **tableau 8, colonne 3** et le **tableau 9, colonne 4, respectivement**.

### **Conditions expérimentales pour l'enregistrement des courants capacitifs en potentiel imposé**

Le potentiel de membrane est maintenu à -50mV. Un choc hyperpolarisant de -10mV est appliqué pendant 15ms sur le corps cellulaire des neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis pour générer un courant capacitif. Ce protocole permet de déterminer la ou les constante(s) de temps du courant capacitif en associant la phase décroissante de ce courant à une fonction mono- ou bi-exponentielle.

## **3.4. Conditions expérimentales en courant imposé**

La technique du courant imposé est utilisée pour suivre les variations du potentiel de membrane issues de l'activation de canaux ioniques et récepteurs. La différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule est alors mesurée pendant l'application d'un courant continu dans la cellule en configuration cellule entière. Cette technique permet d'étudier la réponse électrophysiologique (potentiel d'action, potentiel postsynaptique excitateur ou inhibiteur) d'une cellule à un stimulus.

Dans notre étude, cette technique a été utilisée pour les variations de potentiel induites par l'activation des nAChRs suite à l'application par le bain d'ACh sur le corps cellulaire des neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. La durée d'application de l'ACh est de 1s. Pour le détail de la composition des solutions intrapipettes et extracellulaires utilisées pour mesurer les variations de potentiel induit par les agonistes cholinergiques, voir le **tableau 8, colonne 1** et le **tableau 9, colonne 1**, respectivement. Les expériences sont réalisées en présence d'atropine (100nM). Cette technique a aussi été utilisée pour déterminer le potentiel de repos des neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. Dans ce cas, l'évolution du potentiel de membrane est suivie alors qu'aucun courant n'est appliqué.

### 3.5. Composition des solutions

Les solutions extracellulaires contenant les agonistes, insecticides et les bloqueurs des canaux potassiques, sodiques et calciques sont superfusées grâce à un système de perfusion gravimétrique VC-6M (Harvard apparatus) contrôlé par le logiciel pClamp. Le débit de perfusion est de 0,5mL/min et l'éjecteur est placé à 10µm du corps cellulaire du neurone pendant l'application. Ce système de perfusion permet de changer rapidement le milieu « superfusant » le corps cellulaire du neurone. L'excès de solution est aspiré à l'opposé de la perfusion pour renouveler le milieu dans lequel baignent les neurones. Tous les produits utilisés proviennent de Sigma Chemicals (L'isle d'Abeau Chesnes, France).

Dans la technique du patch-clamp en configuration cellule entière, la composition de la solution intrapipette s'approche de celle du milieu intracellulaire du neurone de moustique et limite la dilution des éléments métaboliques qui altérerait le fonctionnement des canaux ioniques et des récepteurs. Les compositions des solutions intrapipettes et des solutions extracellulaires utilisées pour mesurer les courants induits par les agonistes cholinergiques, les courants sodiques et calciques sont respectivement indiquées dans les **tableaux 8 et 9**.

<b>Composés (mM)</b>	<b>Mesure des courants induits par les agonistes cholinergiques</b>	<b>Mesure des courants calciques</b>	<b>Mesure des courants sodiques</b>
<i>K<sup>+</sup>-Gluconate</i>	130		
<i>K<sup>+</sup>-Fluoride</i>	10		
<i>NaCl</i>	10	7	7
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	3	3	2
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	0,1	0,1	
<i>EGTA</i>	1,5	1,5	2
<i>ATP-Mg</i>	1	3	1
<i>HEPES</i>	10	10	10
<i>CsCl</i>		140	140
	pH ajusté à 7,2 avec KOH	pH ajusté à 7,2 avec KOH	pH ajusté à 7,2 avec CsOH

Tableau 8 : Composition des solutions intrapipettes utilisées dans les expériences de patch-clamp.

<b>Composés (mM)</b>	<b>Mesure des courants induits par les agonistes cholinergiques</b>	<b>Solution dépourvue d'ions calcium</b>	<b>Mesure des courants calciques</b>	<b>Mesure des courants sodiques</b>
<i>NaCl</i>	130	130		130
<i>KCl</i>	2,5	2,5	2,5	5
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	3	8	3	2
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	5		5	0,5
<i>EGTA</i>		10		
<i>HEPES</i>	5	5	10	10
<i>Atropine</i>	0,1	0,1		
<i>Chlorure de choline</i>			100	
<i>TEA-Cl</i>			30	50
<i>4-AP</i>			5	5
<i>CdCl<sub>2</sub></i>				0,5
	pH ajusté à 7,2 avec NaOH	pH ajusté à 7,2 avec NaOH	pH ajusté à 7,2 avec NaOH	pH ajusté à 7,2 avec NaOH

Tableau 9 : Composition des solutions extracellulaires utilisées dans les expériences de patch-clamp.

## 4. Technique d'imagerie calcique

### 4.1. Principe

L'imagerie calcique est une technique qui permet de visualiser les variations de calcium intracellulaire dans une cellule. La mesure des variations de calcium intracellulaire s'appuie sur l'utilisation d'indicateurs capables de se lier au calcium. Dans notre étude, l'indicateur utilisé est une sonde chimique appelée Fura-2 pentakis(acetoxymethyl) ester (Fura-2AM) (Sigma-Aldrich, St-Louis, Etats-Unis). Cette forme de l'ester acétoxyméthyle (AM) permet à la sonde de traverser la membrane du neurone isolé pour un chargement intracellulaire non invasif. L'AM est ensuite clivée par les estérases intracellulaires après pénétration dans la cellule. Cette sonde chimique est à la fois chélatrice de calcium et fluorophore ce qui lui permet de se fixer spécifiquement au calcium intracellulaire libre. La fixation du Fura-2 au calcium induit un changement de conformation et de longueur d'onde d'excitation par les rayons ultraviolets (**Figure 37A**). Sa longueur d'onde d'excitation passe alors de 380 nm lorsqu'elle est libre à 340 nm lorsqu'elle est fixée au calcium, mais sa longueur d'onde d'émission est toujours à 510 nm (**Figure 37B**) (Grienberger et Konnerth, 2012; Goulu, 2015). Cette sonde est dite « double excitation simple émission ». L'utilisation de cette sonde permet donc la mesure ratiométrique en temps réel des variations de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

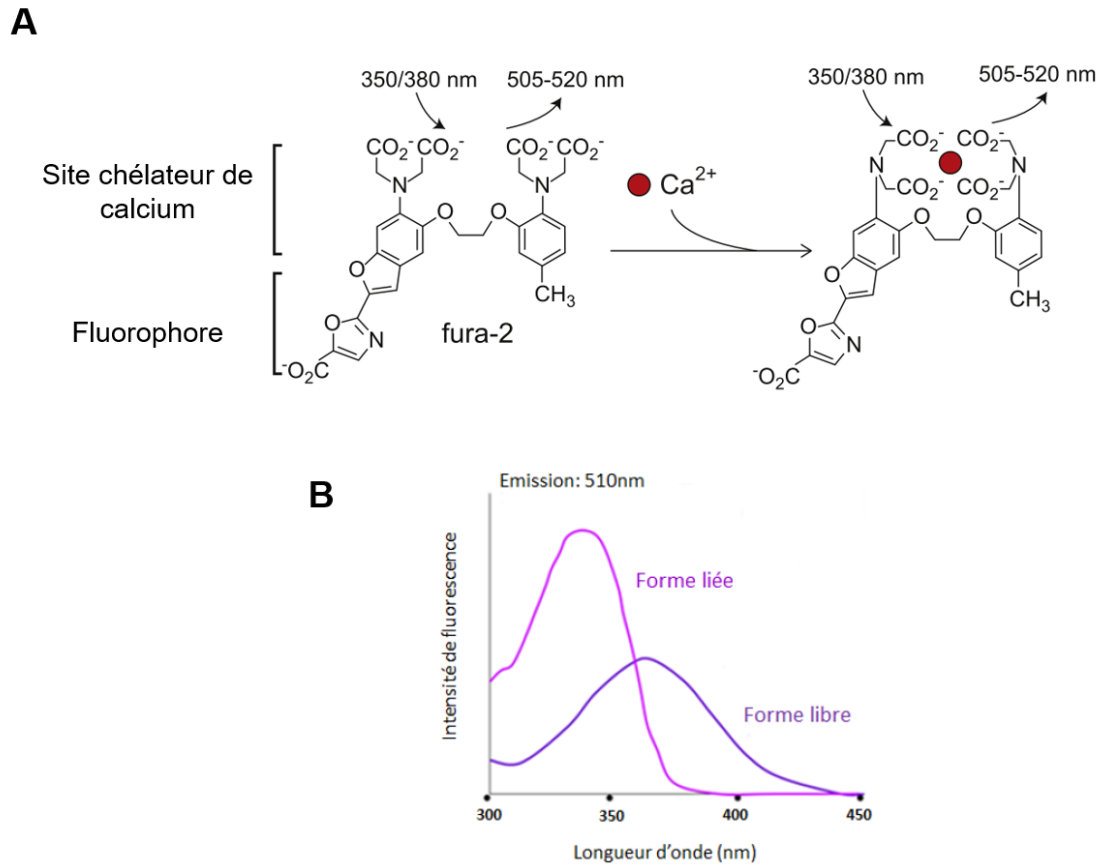


Figure 37 : A) Représentation de la structure chimique de la sonde Fura-2 libre et liée à un ion calcium, B) Spectre d'excitation de la sonde Fura-2 sous sa forme libre (380 nm) et sous sa forme liée au calcium (340nm) (Grienberger et Konnerth, 2012 et Goulu, 2015).

## 4.2. Dispositif d'enregistrement

Après dissociation cellulaire, les cellules déposées sur lame de verre borosilicaté sont rincées deux fois avec de la solution extracellulaire (**Tableau 8, colonne 1**) et incubées dans le noir à 29°C pendant 40 minutes avec 2  $\mu$ M de Fura-2AM. Les lames sont ensuite montées dans une chambre d'enregistrement (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) reliée à un système de perfusion gravimétrique. La lame est ensuite observée au microscope inversé Nikon Eclipse Ti à épifluorescence (Nikon, Tokyo, Japan). La source d'excitation correspond à une lampe xenon intégrée de 75 W et passe au travers d'un commutateur DG4 (Sutter instrument, Novato, CA, USA) afin de ne laisser passer que les longueurs d'ondes d'excitation (340 et 380nm). La fluorescence est acquise via une caméra Orca-R2 CCD (Hamamatsu photonics, Shizuoka, Japan) et traitées avec le logiciel Imaging Workbench v6 (version 6, Indec BioSystems Santa Clara, CA, USA).

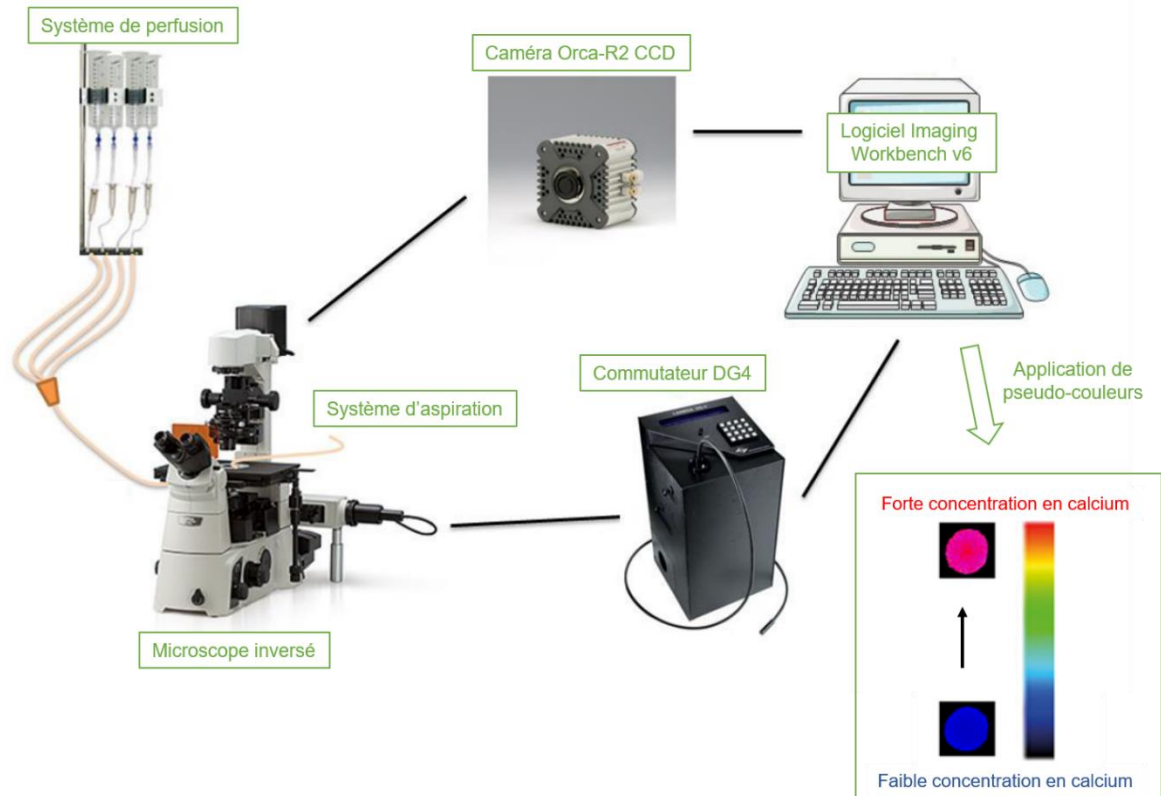


Figure 38 : Représentation schématique de l'installation d'un poste d'imagerie calcique et visualisation des variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  par l'application de pseudo-couleurs grâce au logiciel Imaging Workbench v6.

Le logiciel permet de commander toute l'expérimentation en définissant les longueurs d'onde, le temps d'exposition (100ms) et les pseudo-couleurs (**Figure 38**). Les images sont acquises toutes les trois secondes pour éviter le photoblanchiment<sup>4</sup>. Le niveau de calcium intracellulaire est exprimé en ratio 340/380 nm. L'évolution du ratio 340/380 nm en fonction du temps est reportée dans le logiciel Microsoft Excel 2016 pour extraire le ratio maximum. La différence entre le ratio maximum et le ratio de base est alors calculée ( $\Delta$ ratio 340/380 nm). Les expériences sont réalisées à température ambiante (20-22°C).

Les données sont représentées graphiquement puis exprimées statistiquement par l'utilisation de tests *t* paramétriques (Student) ou non-paramétriques (Mann-Whitney) grâce au logiciel GraphPad Prism version 8. Les données sont exprimées avec la moyenne  $\pm$  S.E.M..

---

<sup>4</sup>Le photoblanchiment est un phénomène de photodestruction du chromophore des protéines fluorescentes (Duan et al., 2013).

### 4.3. Composition des solutions

La solution extracellulaire utilisée pour mesurer les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  induites par les agonistes cholinergiques est la même que celle qui est utilisée dans les expériences de patch-clamp pour mesurer les courants induits par ceux-ci (**Tableau 9**). Les mêmes systèmes de perfusion et d'aspiration sont utilisés pour contrôler le milieu dans lequel baignent les corps cellulaires des neurones.

## 5. RT-qPCR

### 5.1. Principe

La réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR), ou PCR en temps réel, permet de déterminer la quantité initiale d'ADN contenue dans un échantillon en mesurant le nombre d'amplicons. Le processus d'amplification PCR est suivi par détection de la fluorescence émise par les produits de la PCR. Pour cela, un agent intercalant est utilisé, le SYBR Green dont la fluorescence augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. L'analyse des courbes d'amplification permet de déterminer le Ct (Cycle threshold) qui correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaire pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif par rapport au bruit de fond (valeur seuil).

Cette méthode est adaptée à la quantification des ARN messagers (ARNm) contenus dans un échantillon si elle est précédée d'une étape de transcription inverse pour convertir l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc), on parle alors de RT-qPCR. La RT-qPCR peut être réalisée en une ou deux étapes. Dans le premier cas, la transcription inverse des ARNm en ADNc et l'amplification de l'ADNc est réalisée simultanément. Dans le deuxième cas, ces étapes sont séparées, cette approche est utilisée dans notre étude (**Figure 39**).

La quantification par qPCR peut être absolue ou relative. La quantification relative est souvent utilisée pour comparer le niveau d'expression d'un gène-cible dans deux conditions expérimentales en normalisant son niveau d'expression sur celui de gènes de référence. Les gènes de référence sont choisis pour leur stabilité entre les individus, cellules et conditions expérimentales (e.g. l'actine ou rps7) (Ho-Pun-Cheung et al., 2009). La méthode la plus utilisée est le calcul de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .



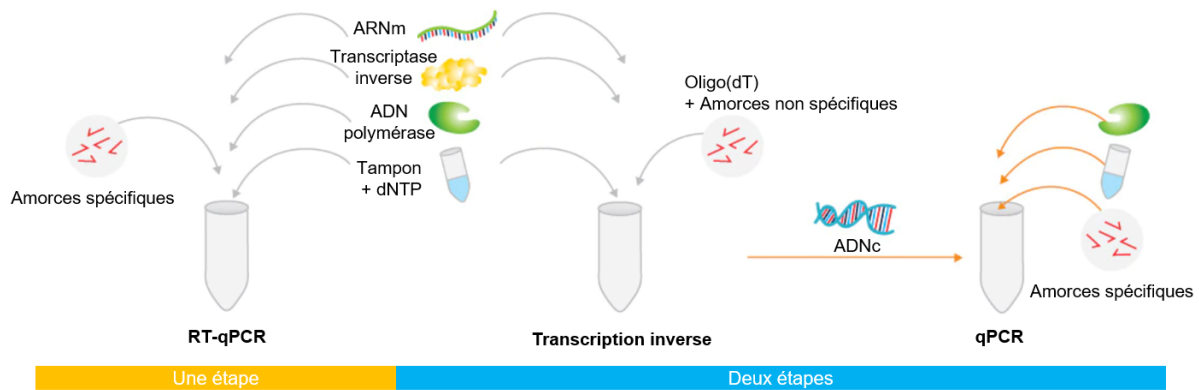


Figure 39 : Schéma des mix de RT-qPCR en une et deux étapes (Modifié d'après ThermoFischer.com, 2021).

## 5.2. Protocole et amorces

Les neurones sont isolés à partir de 10 têtes de moustiques femelles émergentes (**cf. Matériels et méthodes, chapitre 2, partie 2.**). La suspension neuronale est centrifugée à 13000g pendant 10 minutes. Les culots sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les ARNs totaux sont extraits grâce à un kit Nucleospin RNA® Plus (Macherey Nagel) et élués dans 60 µL d'eau ultra-pure exempte de RNase/DNase. L'ARNm est précipité avec du glycogène, de l'acétate de sodium et de l'éthanol à -80°C sur la nuit. Les culots issus de la centrifugation (12000g pendant 15 minutes à 4°C) sont rincés 2 fois à l'éthanol à 75%, séchés à l'air et resuspendus dans 20 µL d'eau ultra-pure exempte de RNase/DNase. La transcription inverse est dans un volume de 20 µL contenant 1,5 µg d'ARNm et 500 ng d'oligo(dT) avec le kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific). Les expériences de PCR quantitative en temps réel sont réalisées dans un volume de réaction de 20 µL avec le kit MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay Low ROX (Eurogentec), 1 µM de primers et 5 µL d'ADNc dilués à 1/20.

L'appareil dans lequel les cycles de PCR se déroulent est un système de détection CFX Connect Real-Time PCR (Bio-rad) avec le programme suivant : 1<sup>ère</sup> étape à 95°C pendant 5 minutes puis 40 cycles de 15 s à 95°C, 62°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 minute. Une fois les PCRs terminées, une analyse des courbes de fusion a été menée. Quatre réplicats sont obtenus sur chaque souche de moustiques Kis et AcerKis. Le niveau d'expression de la sous-unité  $\alpha 1$  des canaux calciques dépendants du potentiel est normalisé par rapport au niveau d'expression des gènes de référence de *rps7* (gène de la petite sous-unité ribosomale) et de

l'actine. L'expression relative est calculée en utilisant la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Pfaffl, 2001). Les amorces utilisées sont indiquées dans le **tableau 10**. Les données sont représentées graphiquement puis analysées à l'aide d'un test one-way ANOVA avec un intervalle de confiance de 95% grâce au logiciel GraphPad Prism version 8.

Gène	Amorce sens (5' vers 3')	Amorce anti-sens (5' vers 3')
Rps7	GCCATCCTGGAGCTGGAGATGAA	GACGGGTCTGTACCTTCTGGA
Actine	CAGTCCAAGCGTGGTATCCTCA	CTCAGTCAGCAGGACTGGGTGCT
Ca <sub>v</sub>	TTCGATGAAGTTTTACCGCCAAC	TGCTAGAACCACCCTTCATTCC

Tableau 10 : Séquences des amorces utilisées dans les expériences de RT-qPCR.

## Chapitre 3 : Test de l'activité larvicide des associations insecticide/répulsif *in vivo* sur larves de moustiques sensibles et résistants

### 1. Principe

Le test en gobelets a pour but d'évaluer et de suivre le niveau de sensibilité (ou de résistance) de stades larvaires sans distinction de sexe d'une espèce de moustiques à un insecticide. C'est un test standardisé par l'OMS (OMS, 2005). Ce test permet également de comparer l'efficacité de plusieurs insecticides (formulation ou matière active) vis-à-vis d'une espèce donnée ou encore de comparer la sensibilité de plusieurs espèces de moustiques vis-à-vis d'un insecticide donné. Les larves sont déposées dans un volume d'eau dans lequel sont diluées les matières actives à tester.

### 2. Protocole et solutions

Les gobelets en plastique de 200 ml sont remplis de 99 mL d'eau osmosée, qui sera ensuite complétée avec 1 mL de la solution contenant les insecticides / répulsifs dilués dans l'éthanol à la concentration adaptée. Vingt-cinq larves de stade fin L3 - début L4 sont triées et filtrées dans des passettes pour enlever le volume excédent d'eau (Figure 47). Elles sont ensuite déposées dans chaque gobelet. Cent larves (4 gobelets) sont exposées à chaque concentration d'insecticide pour calculer rapidement un pourcentage de mortalité. Cent larves sont utilisées comme contrôle négatif (99mL d'eau osmosée + 1mL d'éthanol). Pour chaque test de combinaisons insecticide / répulsif, un contrôle positif de l'efficacité de chacune des molécules séparées est effectué avec 100 larves par concentration.



Figure 40 : Tri des larves d'*An. gambiae* pour les tests larvaires.

Les solutions mères d'insecticides sont préparées en diluant les insecticides sous forme de matière technique (insecticide pur) dans l'éthanol à une concentration de 1g/L. L'IR3535 est dilué directement dans les gobelets à la concentration désirée (de 0,1 à 4g/L). La clothianidine (Sigma-Aldrich, L'isle d'Abeau Chesnes, France) et le triflumézopyrime (LGCstandards, Royaume-Uni) n'ont jamais été testés auparavant sur les larves de moustique *An. gambiae*. Pour les pré-tests, les larves de moustiques sont exposées à une large gamme de concentrations (5 à 6 concentrations allant de  $10^{-4}$  à 10 mg/mL) pour déterminer l'intervalle des concentrations où l'efficacité varie entre 0 et 100%. Après le prétest, la gamme de concentrations est resserrée (4-5 concentrations testées induisant entre 0 et 100% de mortalité) pour déterminer les concentrations létales  $CL_{30}$  (concentration induisant 30% de mortalité),  $CL_{50}$  et  $CL_{95}$  à 24 et 48h sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. Les larves sont ensuite placées dans une enceinte ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$  ; photopériode de 12h:12h) et des lectures de mortalité sont effectuées après 24 et 48h d'exposition à l'insecticide. Les larves sont nourries après la lecture de mortalité à 24h pour éviter la mortalité qui serait dû à la famine.

Lors de la lecture de mortalité, les larves moribondes sont comptées comme mortes. Les larves moribondes sont celles qui sont incapables de retourner à la surface de l'eau pour respirer ou se nourrir, elles ne répondent pas non plus de façon coordonnée aux stimulations mécaniques sur le gobelet. Les larves mortes sont celles qui ne bougent plus même lorsqu'elles sont stimulées par des petits courants d'eau au niveau de l'abdomen.

Pour valider les CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub> et CL<sub>95</sub> à 24 et 48h, 3 réplicats au minimum sont réalisés sur les larves des trois souches de moustiques sur des lots de larves différents en changeant les solutions mères et filles d'insecticides. Pour que le test soit validé, la mortalité dans les gobelets témoins doit être inférieure à 20%, si la mortalité est comprise entre 0 et 20%, la mortalité des larves traitées est corrigée selon la formule d'Abbott (Abbott, 1925).

<b>Formule d'Abbot :</b> $\text{Mortalité corrigée} = \frac{\%mortalité\ Traités - \%mortalitéTémoins}{100 - \%mortalitéTémoins} \times 100$
--

Le test n'est pas pris en compte si le nombre de nymphes dans les gobelets est supérieur à 10%. De plus il faut obligatoirement obtenir quatre points >0% et <100% pour l'analyse de la relation concentration / mortalité pour que le test soit retenu.

### 3. Analyse des résultats

#### 3.1. Calcul des concentrations létales d'insecticides à 24 et 48h sur les larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis.

L'analyse log-probit est utilisée pour mesurer la relation entre l'intensité d'un stimulus (concentration d'insecticide) et la proportion des observations montrant une réponse au stimulus (nombre de larves mortes par rapport au nombre de larves vivantes). Cette méthode permet la linéarisation de la courbe concentration-effet sigmoïdale caractéristique obtenue lors des tests insecticides et la détermination des concentrations létales induisant n% de mortalité avec un intervalle de confiance de 95%.

L'analyse utilisée dans cette étude suit la méthode de Finney en utilisant le script BioRssay mis à jour régulièrement sur le logiciel R (Finney, 1971 ; Milesi *et al.* 2013). Ce script utilise un modèle de régression linéaire excluant le 0 et 100 % de mortalité pour obtenir le meilleur ajustement possible de la courbe log concentration-probit mortalité. Pour améliorer l'ajustement du modèle, un minimum de 4 à 5 concentrations d'insecticides doivent strictement induire entre 0 et 100% de mortalité dans chaque test. La validité statistique de l'ajustement évaluée avec un test du khi-deux. Les CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub> et CL<sub>95</sub> à 24 et 48h calculées dans chaque réplicat de la même condition et sont moyennées pour chacune des trois souches de moustiques.

### 3.2. Evaluation de la synergie entre le répulsif IR3535 et les insecticides sur les larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis

La synergie entre le répulsif IR3535 et la clothianidine ou le triflumézopyrime est évaluée en comparant la mortalité induite par la combinaison des molécules (IR3535 + CLO ou IR3535 + TFM), c'est-à-dire la mortalité observée, avec la somme des mortalités induites par les molécules séparément, c'est-à-dire la mortalité attendue. La mortalité attendue est calculée par la formule suivante :

$$\text{Mortalité attendue} = M_{IR3535} + M_{\text{insecticide seul}} (1 - M_{IR3535 \text{ seul}}/100)$$

où  $M_{IR3535}$  est le pourcentage de mortalité induit par l'IR3535 seul à la concentration considérée,  $M_{\text{insecticide}}$  est le pourcentage de mortalité induit par l'insecticide seul à la concentration considérée. La mortalité attendue a été comparée à la mortalité observée grâce à un test du khi-deux dans le logiciel GraphPad Prism version 8. Si la mortalité observée est significativement supérieure à la mortalité attendue, alors on considère que la combinaison de l'IR3535 avec l'insecticide induit un effet synergique (Farenhorst et al., 2010).

## Résultats

Afin de pouvoir développer de nouvelles stratégies de lutte ciblant les nAChRs exprimés par *An. gambiae*, il est nécessaire de mieux caractériser le système cholinergique chez cet insecte et de déterminer comment celui-ci peut être influencé par des mutations de cibles conférant la résistance aux insecticides. Pour commencer, les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des nAChRs exprimés par les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis sont étudiées par une approche multidisciplinaire grâce à la technique du patch-clamp, de l'imagerie calcique et de biologie moléculaire. Ainsi, le premier chapitre des résultats porte sur l'étude *in vitro* de l'influence des mutations G119S et L1014F conférant respectivement la résistance *ace-1<sup>R</sup>* aux organophosphorés/carbamates (souche AcerKis) et la résistance *kdr* aux pyréthriinoïdes (souche KdrKis) sur l'effet de l'ACh. Ces résultats sont comparés à l'effet de l'ACh sur les neurones isolés d'une souche sensible de référence (souche Kis).

Le deuxième chapitre porte sur l'effet *in vitro* des insecticides néonicotinoïde et mésoionique ciblant les nAChRs sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. L'influence des mutations G119S et L1014F sur l'effet de la clothianidine et du triflumézopyrime est ainsi évaluée.

Le troisième et dernier chapitre porte donc sur l'étude de l'effet insecticide *in vivo* de la clothianidine et du triflumézopyrime seuls dans un premier temps grâce à des tests larvaires homologués par l'OMS réalisés sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. Dans un deuxième temps, l'effet synergique du mélange clothianidine/IR3535 et triflumézopyrime/IR3535 *in vivo*. L'IR3535 est détourné de son utilisation principale en tant que répulsif et est utilisé en tant qu'agent synergisant puisqu'une étude récente a décrit un nouveau mode d'action du répulsif IR3535 qui potentialise l'effet des insecticides néonicotinoïdes sur les neurones de blattes *P. americana* par une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Deshayes et al 2018; Moreau *et al.*, 2020)<sup>5</sup>. Les tests larvaires sont fortement reproductibles et s'intègrent dans le développement d'une stratégie de lutte larvicide. Cette dernière a jusqu'à maintenant été compliquée par la difficulté

---

<sup>5</sup> Publication jointe en annexe 1 de ce manuscrit.

à repérer les gîtes larvaires éphémères d'*An. gambiae*. Heureusement, le développement des technologies d'imagerie par satellite, par drones et de la génération d'images à haute résolution des paysages rend les gîtes larvaires beaucoup plus faciles à repérer et à cibler dans les interventions larvicides (Mushinzimana *et al.*, 2006; Catry *et al.*, 2018; Carrasco-Escobar *et al.*, 2019; Hardy *et al.*, 2019). Ces techniques permettent de cartographier la position des gîtes larvaires sur de très grandes zones et ainsi de contourner les contraintes spatiales qui rendent ces gîtes peu accessibles pour les repérages à l'échelle humaine. La faisabilité opérationnelle de la lutte larvicide contre *An. gambiae* et les autres moustiques vecteurs d'agents pathogènes est donc en constante amélioration (Derua *et al.*, 2019).



## Chapitre 1 : Propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques des neurones isolés de moustiques Kis AcerKis et KdrKis

L'ACh est le neurotransmetteur exciteur endogène le plus important dans le système nerveux des insectes et les nAChRs ciblés par l'ACh sont des cibles d'intérêt grandissant en LAV car ils sont impliqués dans la transmission synaptique rapide de l'information nerveuse (Ihara *et al.*, 2017; Matsuda *et al.*, 2020). Avant de tester l'effet de molécules insecticides, il est nécessaire de caractériser l'effet de ce neurotransmetteur sur les nAChRs exprimés par *An. gambiae* afin d'adapter le traitement insecticide par la suite. En effet, les insecticides néonicotinoïdes et mésoioniques sont respectivement agonistes et antagonistes compétitifs de ces récepteurs (Cordova *et al.*, 2016; Holyoke *et al.*, 2017; Casida, 2018). Une étude comparative est donc menée en premier lieu sur l'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.

### 1. Effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

#### 1.1. Propriétés du courant ionique induit par l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

L'effet de l'ACh a été étudié grâce à la technique électrophysiologique du patch-clamp en configuration cellule entière en condition de potentiel imposé<sup>6</sup> sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. Sur les neurones isolés des trois souches de moustiques, l'application d'ACh à 1mM (**Figure 41A**) pendant 3s à un potentiel de référence de -50mV induit un courant ionique entrant transitoire dont l'amplitude est très variable selon la souche (**Figure 41B**). Comme illustré en **figure 41C**, l'amplitude moyenne du courant ionique entrant est respectivement de  $-45,8 \pm 9,5\text{pA}$ ,  $-65,8 \pm 16,8\text{pA}$  et  $-121,1 \pm 30\text{pA}$  sur les neurones isolés

---

<sup>6</sup> Toutes les expériences impliquant l'utilisation d'ACh sont réalisées en présence d'atropine à 100nM pour bloquer les récepteurs cholinergiques de type muscarinique.

de moustiques Kis, KdrKis et AcerKis. L'amplitude moyenne de ce courant ionique entrant n'est pas significativement différente entre les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. Par contre, l'amplitude est environ 2,5 fois plus importante dans les neurones isolés de moustiques AcerKis comparée aux neurones Kis et 1,8 fois plus importante comparée aux neurones KdrKis.

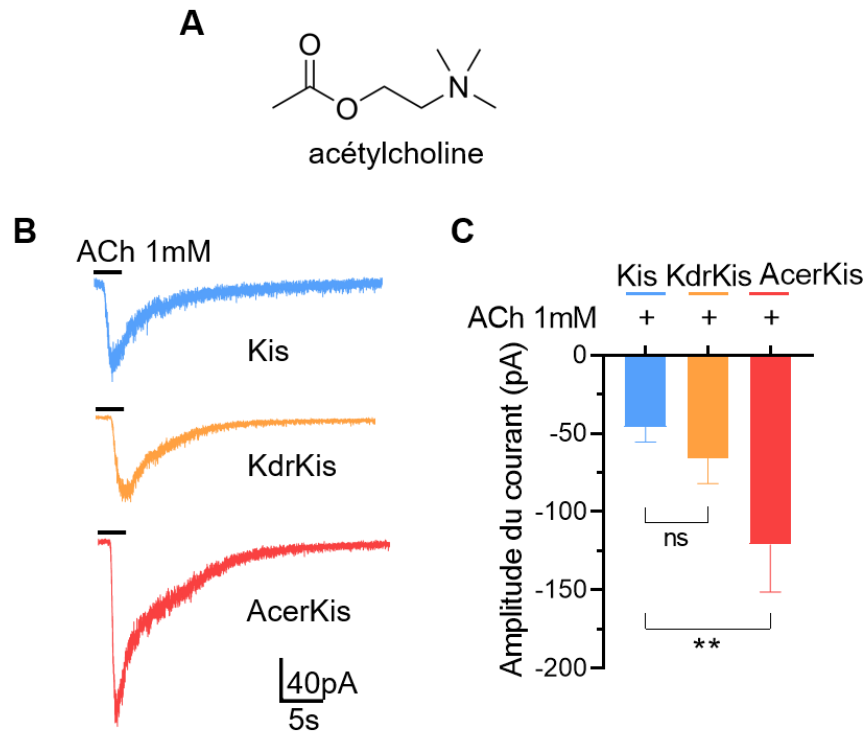


Figure 41 : Effet de l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. A) Structure chimique de l'ACh. B) Exemples du déroulement du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM (application de 3s, potentiel de référence -50mV) sur les neurones isolés de moustiques Kis, KdrKis et AcerKis. C) Histogrammes comparatifs illustrant l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=16), KdrKis (n=10) et AcerKis (n=7). Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif ; \*\* $p < 0,01$ .

Pour vérifier que le courant ionique entrant induit par l'application d'ACh est dû à l'activation des nAChRs, l' $\alpha$ -bungarotoxine ( $\alpha$ -bgt), un antagoniste compétitif spécifique des nAChRs a été appliquée en prétraitement pendant 5 minutes sur les corps cellulaires des neurones isolés de moustiques Kis, KdrKis et AcerKis puis co-appliquée avec l'ACh à 1mM. L'application par le bain d' $\alpha$ -bgt entraîne une inhibition totale du courant ionique entrant induit par l'application d'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis (**Figure 42A, B**). Par contre, l' $\alpha$ -bgt n'induit aucune inhibition du courant sur les neurones isolés de moustiques KdrKis (**Figure 42C**).

Puisque l'effet de l' $\alpha$ -bgt est différent sur les neurones KdrKis, nos résultats suggèrent l'existence de populations de nAChRs différentes exprimées par les neurones isolés de moustiques *An. gambiae* sensibles et résistants aux insecticides.

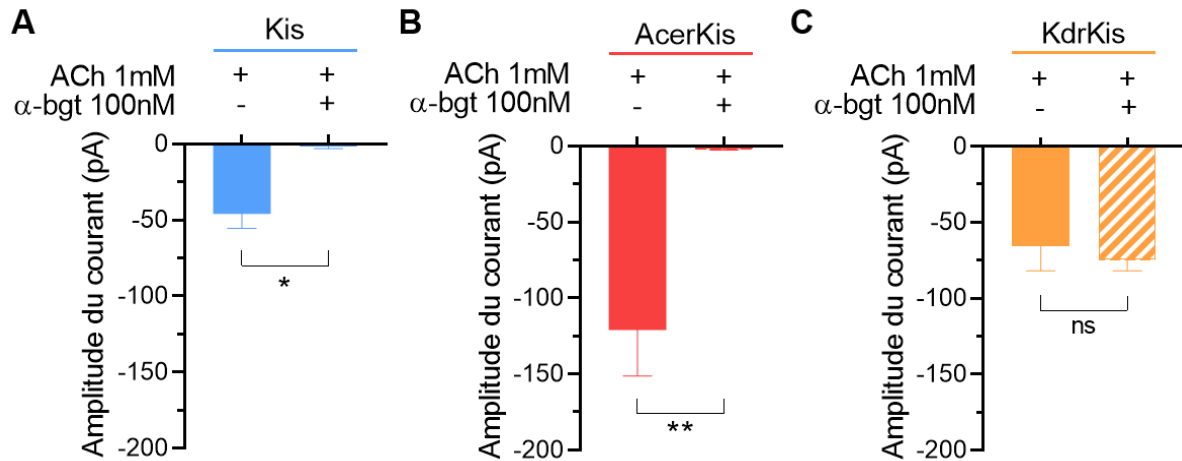


Figure 42 : Histogrammes comparatifs illustrant l'effet de l'application par le bain d' $\alpha$ -bgt à 100nM pendant 5 minutes sur l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM (application de 3s, potentiel de référence -50mV) sur les neurones isolés de moustiques A) Kis, B) AcerKis et C) KdrKis (n=4-6). Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif ; \* $p$ <0,05 ; \*\* $p$ <0,01.

## 1.2. Dépendance vis-à-vis de la concentration de l'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

Pour étudier de façon quantitative l'effet de l'ACh sur les neurones isolés des différentes souches de moustiques, la courbe effet-log concentration de l'ACh a été établie sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis<sup>7</sup>. L'ACh a été testée dans une gamme de concentrations comprises entre 100nM et 1mM.

Sur les neurones isolés de moustiques Kis, l'effet de l'ACh augmente avec la concentration. La courbe effet-log concentration présente un aspect biphasique atypique (**Figure 43A, B**) avec un plateau observé entre 30 $\mu$ M et 100 $\mu$ M d'ACh avant d'atteindre une amplitude maximale à 1mM (-45,8  $\pm$  9,5pA).

<sup>7</sup> Pour le détail des équations de Hill utilisées pour établir les courbes effet-log concentrations, voir Perrier *et al.*, 2021 en annexe 2, équations 1 et 2.

Sur les neurones isolés de moustiques AcerKis, l'effet de l'ACh augmente avec la concentration. Le décours de la courbe effet-log concentration de l'ACh est monophasique, mais l'amplitude du courant ionique entrant est plus importante que sur les neurones isolés de moustiques Kis à partir d'une concentration de 100 $\mu$ M d'ACh (**Figure 43A**). Cette augmentation de l'amplitude du courant fait disparaître le 1<sup>er</sup> plateau qui est observé entre 30 $\mu$ M et 100 $\mu$ M d'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis.

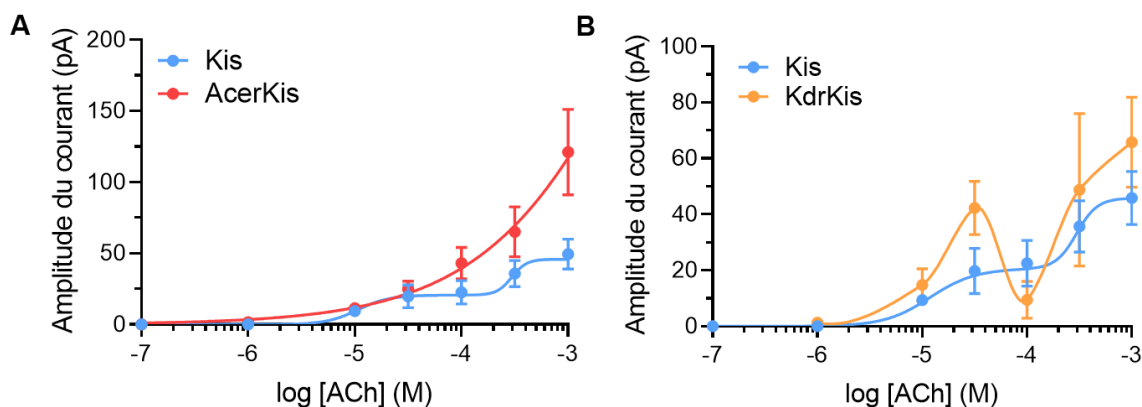


Figure 43 : Superposition des courbes effet-log concentration d'ACh réalisées à partir de la mesure de l'amplitude des courants ioniques enregistrés sur les neurones isolés de moustiques A) Kis (n=5-15) et AcerKis (n=3-14), B) Kis et KdrKis (n=3-12). Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M..

Sur les neurones isolés de moustiques KdrKis, le décours de la courbe effet-log concentration d'ACh est multiphasique (**Figure 43B**). Cependant, alors que l'amplitude du courant ionique entrant n'est pas significativement différente à forte concentration d'ACh (1mM) entre les neurones isolés de moustiques Kis ( $-45,8 \pm 9,5$ pA) et KdrKis ( $-65,8 \pm 16,1$ pA) (**Figures 41C et 43A**), elle est significativement plus importante sur les neurones isolés de moustiques KdrKis ( $-42,3 \pm 9,5$ pA) que sur les neurones isolés de moustiques Kis ( $-19,8 \pm 8,1$ pA) pour une concentration faible d'ACh (30 $\mu$ M). La différence d'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh à 30 $\mu$ M n'est pas statistiquement significative différent entre les neurones KdrKis et AcerKis ( $24,9 \pm 5,6$ pA) (**Figure 44**). L'augmentation d'amplitude du courant ionique entrant à faible concentration d'ACh sur les neurones KdrKis donne un décours « en cloche » entre 1 $\mu$ M et 100 $\mu$ M avec une amplitude maximale du courant atteinte à 30 $\mu$ M.

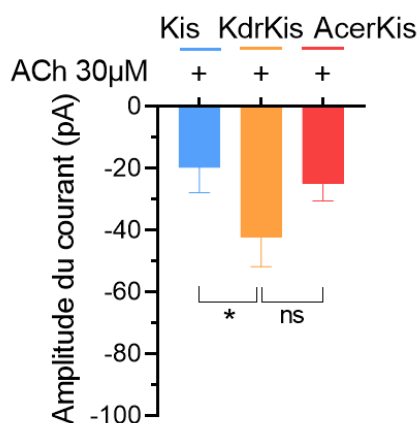


Figure 44 : Histogrammes comparatifs illustrant l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh, 30µM (n=5, n=12 et n=9 pour Kis, KdrKis et AcerKis, respectivement sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. Données exprimées par la moyenne ± S.E.M.. ns : non significatif ; \* $p < 0,05$ ).

L'ensemble des données électrophysiologiques et pharmacologiques issus de l'étude de l'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis est repris dans le **tableau 11**.

	Kis	AcerKis	KdrKis
Amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM (pA)	-45,8 ± 9,5	-121,1 ± 30	-65,8 ± 16,8
Décours de la courbe effet-log concentration d'ACh	Multiphasique	Monophasique	Multiphasique
Log EC50	-4,971 (1 <sup>er</sup> plateau) -3,527 (réponse maximale)	-1,945	Non déterminé*
Sensibilité à l'α-bgt (100nM)	Sensible	Sensible	Insensible

Tableau 11 : Données électrophysiologiques et pharmacologiques issues de l'étude de l'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. \*le décours en cloche de la courbe effet-log concentration ne permet pas une mesure précise de Log EC50.

Les superpositions des courbes effet-log concentration de l'ACh établies sur les neurones isolés de moustiques Kis / AcerKis et Kis / KdrKis illustrées **en figures 43A et B** révèlent des profils de sensibilité à l'ACh différents des nAChRs exprimés dans les neurones isolés de moustiques résistants aux insecticides. Les parties suivantes vont donc consister à déterminer

les mécanismes cellulaires et moléculaires associés aux résistances *ace-1<sup>R</sup>* et *kdr* qui peuvent être à l'origine de cette différence dans l'effet du neurotransmetteur.

## 2. Influence de la mutation *ace-1<sup>R</sup>* sur les propriétés électropharmacologiques des neurones isolés de moustiques AcerKis

### 2.1. Origine de la différence d'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques AcerKis

L'origine de l'augmentation de l'amplitude du courant induit par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustique AcerKis comparée aux neurones Kis et KdrKis a été investiguée. Il a été préalablement montré que l'activité catalytique de l'AChE est fortement diminuée (environ 50%) par la mutation G119S chez *An. gambiae* (Alout *et al.*, 2008; Perrier *et al.*, 2021). Nous avons donc voulu savoir si l'activité catalytique diminuée de l'AChE mutée est responsable de la différence d'effet de l'ACh observée sur les neurones isolés de moustique AcerKis.

#### 2.1.1. Implication de l'AChE dans l'augmentation de l'amplitude du courant induit par l'ACh dans les neurones de moustiques AcerKis

L'activité de l'AChE joue un rôle sur l'amplitude et la durée du courant ionique induit par l'ACh en réduisant le temps de fixation du neurotransmetteur sur les nAChRs pour la durée du courant (Abd-Ella *et al.*, 2015). Il est connu dans la littérature qu'un effet anticholinestérasique se manifeste, du point de vue électrophysiologique, par une augmentation de l'amplitude et de la durée du courant ionique entrant induit par l'ACh.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons déjà observé une augmentation de l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'application d'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques AcerKis comparés aux neurones Kis (**Figure 41C**). Nous avons donc mesuré la durée du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM pour vérifier si cette dernière était augmentée dans les neurones AcerKis, en accord avec un effet anticholinestérasique.

Cependant, nous n'avons pas mesuré de différence significative dans la durée du courant ionique entre les neurones des deux souches ( $5,2 \pm 0,7s$  sur les neurones Kis et  $5,6 \pm 0,5s$  sur les neurones AcerKis) (**Figure 45**).

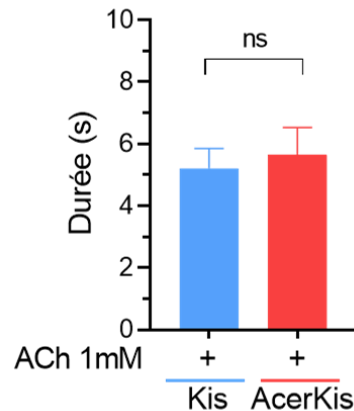


Figure 45 : Histogrammes comparatifs illustrant la durée du courant ionique entrant mesurée à 50% de l'amplitude maximum induit par l'ACh à 1mM (application de 3s, potentiel de référence -50mV) sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=12) et AcerKis (n=7). Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif.

Pour induire une diminution de l'activité de l'AChE sur les neurones isolés de moustiques Kis, l'effet du propoxur (insecticide carbamate anticholinestérasique) a été étudié à une concentration de 100nM en prétraitement de 2 minutes avant l'application d'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis.

Sur les neurones isolés de moustiques Kis, le prétraitement avec le propoxur ne cause pas d'augmentation de l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh. Ce prétraitement ne permet donc pas de restaurer une amplitude du courant similaire à celle observée en condition contrôle sur les neurones AcerKis (**Figure 46A, B**). Comme attendu en raison de la mutation G119S conférant la résistance aux OP et CX, le prétraitement avec le propoxur n'entraîne aucun effet significatif sur l'amplitude et la durée du courant induit par l'ACh sur les neurones isolés de moustiques AcerKis.

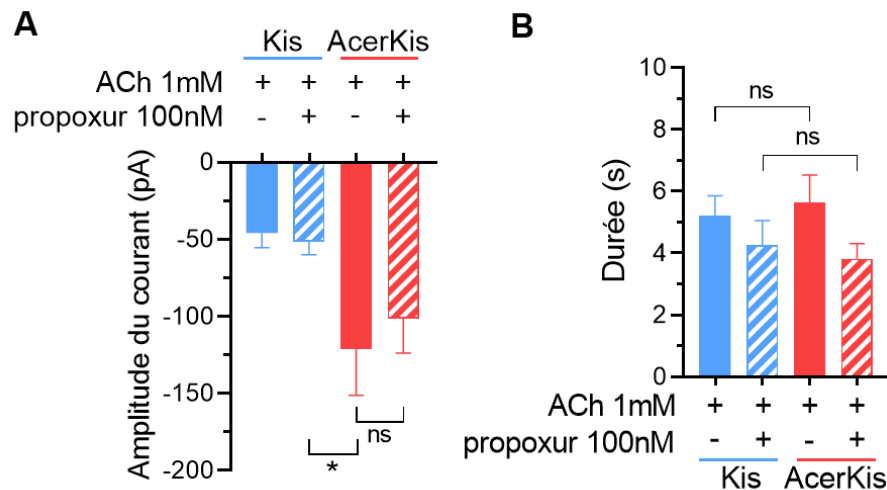


Figure 46 : Histogrammes comparatifs illustrant l'effet d'un prétraitement de 2 minutes avec le propoxur à 100nM sur A) l'amplitude du courant ionique entrant et B) la durée du courant mesurée à 50% de l'amplitude maximum induit par l'ACh à 1mM (application de 3s, potentiel de référence -50mV) sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=10-16) et AcerKis (n=7-11). Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif ; \* $p < 0,05$ .

Ces résultats montrent que l'activité catalytique de l'ACHé, dont l'activité catalytique est réduite dans les neurones AcerKis, n'a pas d'influence sur l'amplitude et la durée du courant ionique entrant induit par l'ACh sur les neurones Kis et AcerKis. Au vu de ces données, il est raisonnable de proposer qu'un autre mécanisme est responsable de l'augmentation de l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh sur les neurones AcerKis. Une modification de la densité des nAChRs à la surface des neurones isolés de moustiques AcerKis expliquerait la différence d'effet de l'ACh entre les neurones Kis et AcerKis.

### 2.1.2. Mise en évidence de l'expression d'une population différente de nAChRs dans les neurones isolés de moustiques AcerKis

Pour déterminer si une population de nAChRs supplémentaire est exprimée dans les neurones isolés de moustiques AcerKis, plusieurs paramètres électrophysiologiques ont été étudiés en condition de potentiel imposé.

L'activation des nAChRs par l'ACh n'est pas instantanée lorsque cette dernière est perfusée sur le corps cellulaire des neurones isolés et le temps au pic du courant ionique traduit le temps que met l'agoniste à induire une réponse lors de sa fixation sur les nAChRs. Ce paramètre est notamment influencé par la densité des nAChRs. Le temps au pic du courant



ionique entrant résultant de l'activation des nAChRs par l'ACh à 1mM a été mesuré sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. Ce temps est significativement plus court sur les neurones isolés de moustiques AcerKis ( $1,1 \pm 0,1s$ ) comparés aux neurones Kis ( $1,7 \pm 0,1s$ ) (**Figure 47**).

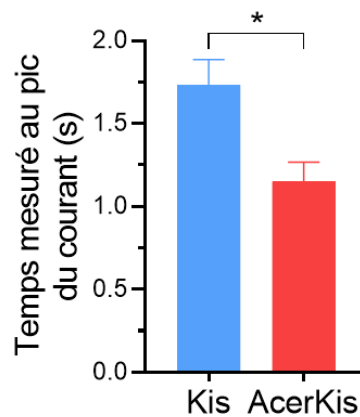


Figure 47 : Temps au pic du courant ionique entrant induit par l'ACh 1mM (application de 3s, potentiel de référence -50mV) sur les neurones Kis (n=16) et AcerKis (n=7). Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. \* $p < 0,05$ .

La surface membranaire peut influencer l'activité des nAChRs en modifiant la densité de ces récepteurs. Le diamètre des corps cellulaires des neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis a été mesuré à l'aide d'un microscope optique équipé d'un micromètre afin de calculer la surface des neurones. Le diamètre ainsi que la surface des neurones isolés de moustiques Kis (diamètre :  $9,0 \pm 0,3\mu m$  ; surface :  $271,8 \pm 17,7\mu m^2$ ) et AcerKis (diamètre :  $8,8 \pm 0,2\mu m$  ; surface :  $258,3 \pm 15,0\mu m^2$ ) ne sont pas significativement différents (**Figure 48A**). La différence d'effet de l'ACh entre les neurones Kis et AcerKis n'est donc pas liée à une variation de la surface des neurones entre les deux souches.

La quantité de charges portées par les ions passant par les nAChRs<sup>8</sup> lors de l'application d'ACh à 1mM après un prétraitement de 2 minutes avec le propoxur à 100nM ainsi que la densité de courant<sup>9</sup> ont été calculés sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. Nous observons

---

<sup>8</sup> La quantité de charge, exprimée en pico-coulomb (pC), est calculée en intégrant l'aire sous le courant induit par l'ACh, pour le protocole de mesure, voir Perrier *et al.*, 2021 en annexe 2, équation 3.

<sup>9</sup> La densité de courant, exprimée en pC/ $\mu m^2$ , est la quantité de charge rapportée à la surface du neurone.

une augmentation de la quantité de charge passant par les nAChRs dans les neurones isolés de moustiques AcerKis ( $25,10 \pm 19,30\text{pC}$ ) comparé aux neurones Kis ( $2,50 \pm 1,20\text{pC}$ ) (**Figure 48B**). De la même manière, la densité de courant est augmentée dans les neurones isolés de moustiques AcerKis ( $0,10 \pm 0,07\text{pC}/\mu\text{m}^2$ ) comparé aux neurones Kis ( $0,01 \pm 0,01\text{pC}$ ) (**Figure 48C**).

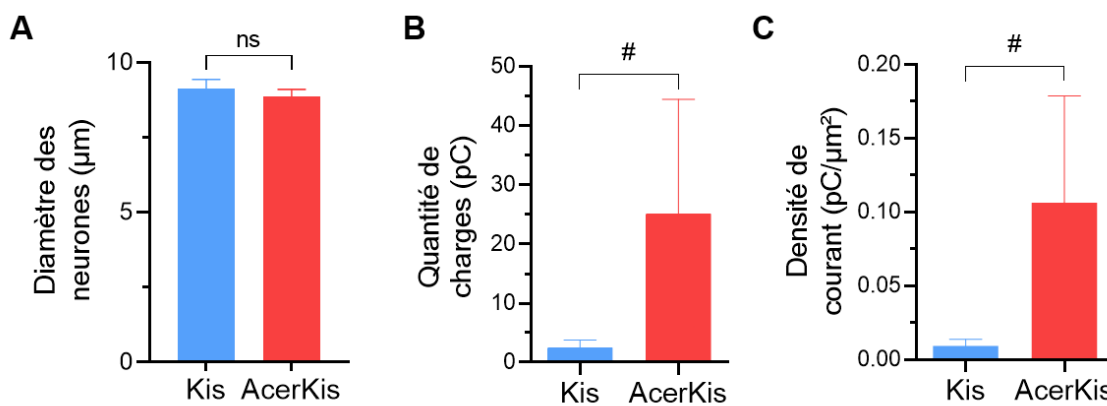


Figure 48 : Mesure du diamètre du corps cellulaire, de la quantité de charges et de la densité de courant passant par les nAChRs des neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. A) Histogrammes comparatifs illustrant le diamètre des corps cellulaires des neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. B) Histogrammes comparatifs illustrant la quantité et C) la densité de courant passant par les nAChRs lors de l'application d'ACh à 1mM (application de 3s, potentiel de référence -50mV) après un prétraitement de 2 minutes avec du propoxur à 100nM sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=4) et AcerKis (n=5). Les données sont exprimées avec la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif ; #p<0,2.

Ces résultats suggèrent qu'il existe une population supplémentaire de nAChRs dans les neurones isolés de moustiques AcerKis. Cette population de nAChRs est activée pour de fortes concentrations d'ACh ( $>100\mu\text{M}$ ). Cette dernière est responsable de l'augmentation de l'amplitude et d'une réduction du temps au pic courant ionique entrant induit par l'ACh observés dans les neurones isolés de moustiques AcerKis par rapport aux neurones Kis.

### 2.1.3. Propriétés des courants capacitifs mesurés sur les neurones de moustiques Kis et AcerKis

La répartition ainsi que le nombre de protéines insérées dans la membrane influencent la capacité membranaire ( $C_m$ ) en modifiant les propriétés diélectriques de la membrane (Gentet *et al.*, 2000; Hernández-Balaguera *et al.*, 2018). Nous avons donc vérifié si l'expression d'une autre population de nAChRs dans les neurones isolés de moustiques AcerKis était corrélée à une

modification de la  $C_m$ . Pour cela, la constante de temps de la phase décroissante du courant capacitif généré par l'application d'un échelon de potentiel hyperpolarisant a été mesurée sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. Dans notre modèle, le circuit électrique représentant la membrane (**Figure 49B**) est alors simple en supposant que le potentiel est le même en tout point de la membrane et que la faible amplitude de l'échelon de potentiel hyperpolarisant n'active pas les canaux ioniques dépendants du potentiel.

Un échelon de potentiel hyperpolarisant de -10mV à partir du potentiel de référence de -50mV a été appliqué pendant 10ms sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis (**Figure 49A, C**). Sur les neurones isolés de moustiques Kis, le déroulement de la phase décroissante du courant capacitif généré par l'échelon de potentiel hyperpolarisant est décrit par une fonction mono-exponentielle qui permet de mesurer la constante de temps ( $\tau = 0,062 \pm 0,002$ , coefficient de corrélation  $R^2 = 0,970$  ; **Figure 49A, D**). Ce résultat indique que le modèle simplifié équivalent de la membrane est adéquat (**Figure 49B**). Au contraire, sur les neurones isolés de moustiques AcerKis, le déroulement de la phase décroissante du courant capacitif est décrit par une fonction bi-exponentielle qui permet de mesurer une constante de temps lente ( $\tau_{\text{slow}} = 0,040 \pm 0,002\text{ms}$ ) et une constante de temps rapide ( $\tau_{\text{fast}} = 0,020 \pm 0,001\text{ms}$ , coefficient de corrélation de la fonction bi-exponentielle  $R^2 = 0,970$  ; **Figure 49C, D**)<sup>10</sup>.

---

<sup>10</sup> Pour le détail des fonctions exponentielles utilisées, voir Perrier *et al.*, 2021 en annexe 2, équation 4 et 5.

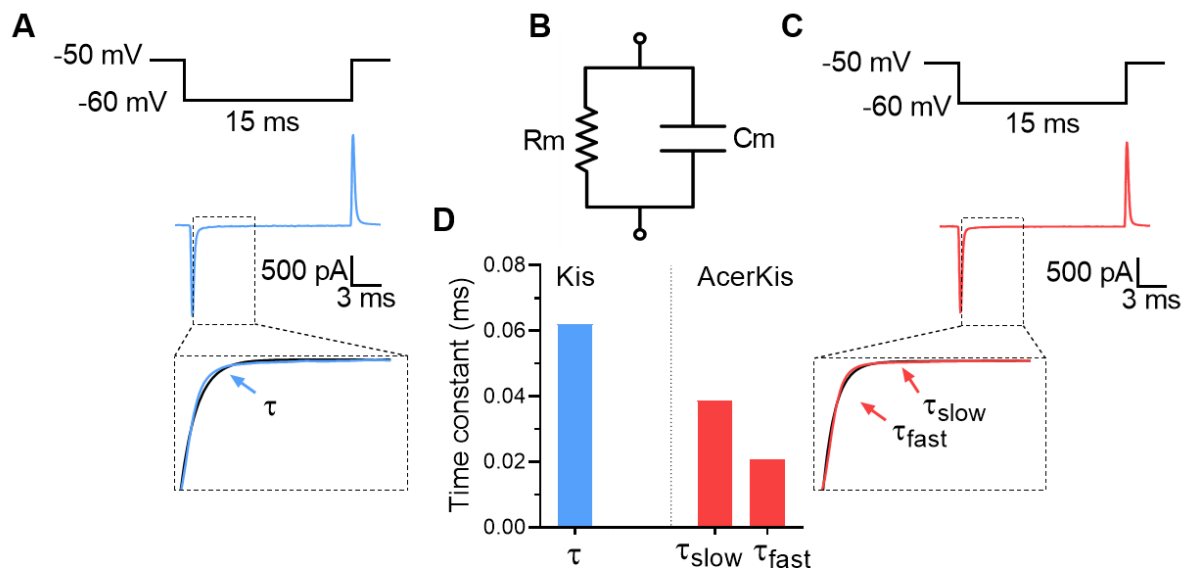


Figure 49 : Etude des courants capacitifs générés par l'application d'un échelon de potentiel hyperpolarisant sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. Exemples représentatifs des courants capacitifs enregistrés en condition de potentiel imposé après l'application d'un échelon de potentiel hyperpolarisant de -10mV pendant 10ms à partir du potentiel de référence de -50mV sur les neurones isolés de moustiques A) Kis et C) AcerKis. B) Représentation du circuit électrique simplifié de la membrane plasmique d'un neurone avec en parallèle la capacité membranaire ( $C_m$ ) et la résistance membranaire ( $R_m$ ). D) Histogrammes représentatifs des valeurs moyennes des constantes de temps du courant capacitif calculées sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis (n=9-10).

En accord avec ces résultats, nous pouvons supposer qu'il y a une répartition hétérogène des protéines à la surface des neurones isolés de moustiques AcerKis. Comme les constantes de temps du courant capacitif mesuré sur les neurones AcerKis sont plus courtes que pour les neurones Kis, on peut supposer que la répartition hétérogène des protéines à la surface est due à l'expression d'une population supplémentaire de nAChRs.

## 2.2. Propriétés électrophysiologiques des nAChRs exprimés par les neurones AcerKis

Nos premiers résultats montrent clairement qu'il existe des différences dans les propriétés électropharmacologiques des nAChRs exprimés par les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. Cette partie est dédiée à déterminer les propriétés électrophysiologiques de la population de nAChRs surexprimés par les neurones AcerKis pour vérifier si elles sont identiques à celles des nAChRs exprimés dans les neurones Kis.

Comme l' $\alpha$ -bgt n'a pas été capable de discriminer les différents types de nAChRs exprimés dans les neurones isolés de moustiques AcerKis (**voir figure 42B**), l'implication du calcium extracellulaire et des nAChRs perméables au calcium dans la réponse à l'ACh a donc été investiguée. Il est connu que les nAChRs sont des récepteurs qui peuvent être perméables au calcium (e.g.  $\alpha 7$  nAChR) et que leur activité peut être également modulée de manière allostérique par le calcium extracellulaire et/ou intracellulaire (Thany et al., 2007, 2008; Bodereau-Dubois et al., 2012; Calas-List et al., 2013; List et al., 2014; Changeux, 2018). La nicotine, l'agoniste de choix des nAChRs, a aussi été testée sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis pour discriminer les différentes populations de nAChRs exprimées.

### 2.2.1. Implication du calcium extracellulaire dans l'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis

#### 2.2.1.1. Participation des canaux calciques dépendants du potentiel dans l'effet de l'ACh sur les neurones AcerKis

La technique d'imagerie calcique a été utilisée sur des neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis chargés avec la sonde fluorescente Fura-2AM (**cf. Matériel et méthodes, chapitre 2, partie 4.**). Avec cette technique, l'intégrité de la membrane plasmique est conservée et le potentiel de membrane n'est pas imposé.

Dans ces conditions expérimentales, l'application d'ACh à 1mM par le bain pendant 5 minutes induit une forte augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis caractérisée par une augmentation de la valeur du  $\Delta$ ratio 340/380nm (**Figure 50A, B**).

Lorsque les expériences sont réalisées après un prétraitement de 5 minutes des neurones isolés avec du  $CdCl_2$  (bloqueur inorganique des canaux  $Ca_v$ ) utilisé à 50 $\mu$ M, l'élévation de calcium induite par l'ACh à 1mM est significativement réduite (26%) dans les neurones AcerKis mais pas dans les neurones Kis (**Figure 50C**). Une concentration plus forte de  $CdCl_2$  (100 $\mu$ M) ne permet pas une inhibition plus importante de la variation de calcium intracellulaire (données non illustrées).

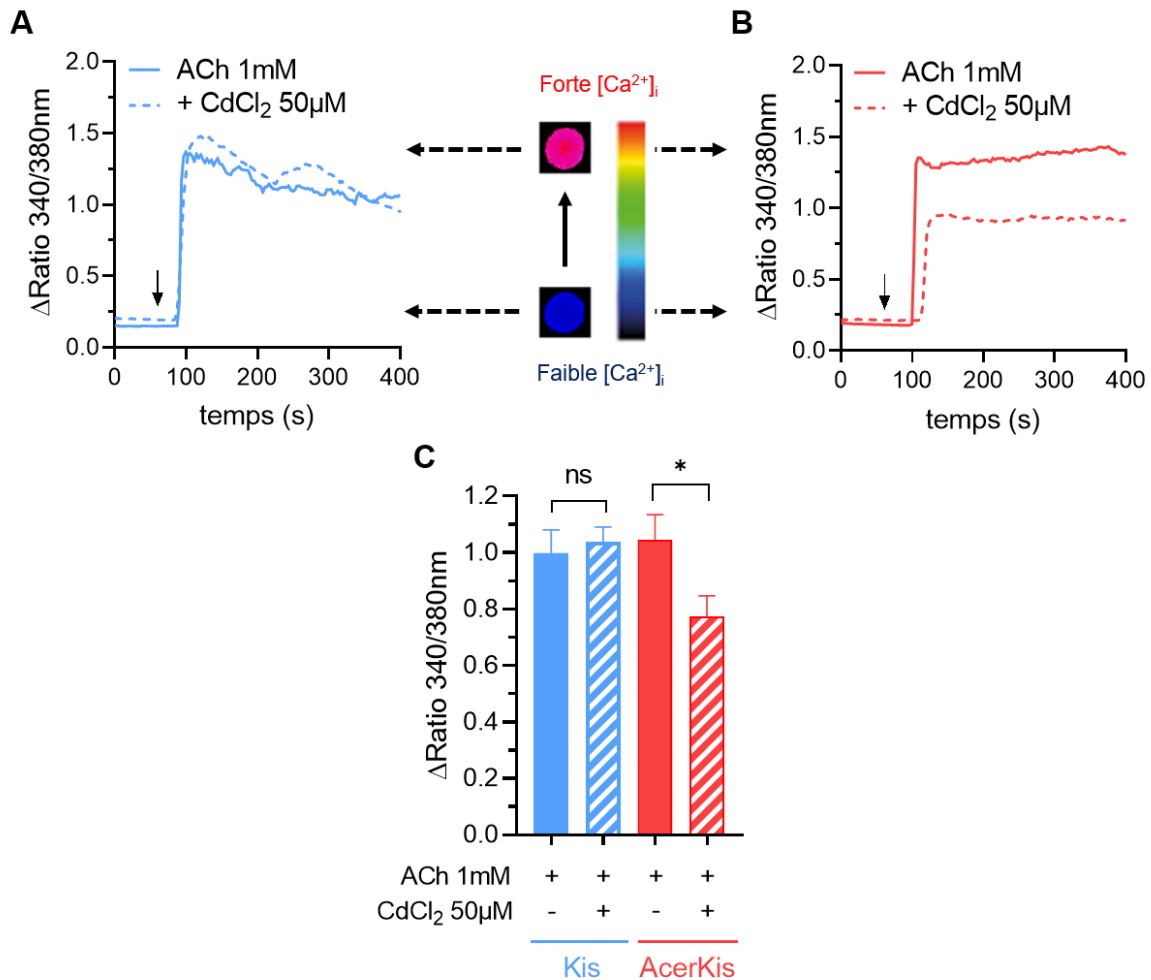


Figure 50 : Effet du CdCl<sub>2</sub> sur les variations de calcium induites par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. A) Spectres représentatifs de l'évolution dans le temps de la variation de calcium intracellulaire exprimée en Δratio 340/380nm pendant l'application d'ACh à 1mM et du CdCl<sub>2</sub> à 50μM sur les neurones isolés de moustiques Kis et B) AcerKis chargés en Fura-2AM. L'inset montre la fluorescence de la sonde Fura-2AM dans un neurone de moustique après application d'ACh à 1mM. C) Histogrammes comparatifs illustrant l'effet sur la variation de calcium de l'application d'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis chargés en Fura-2AM en condition contrôle (n=10-12) et après un prétraitement de 5 minutes avec du CdCl<sub>2</sub> à 50μM (n=10-27). Les données sont exprimées par la moyenne ± S.E.M.. ns : non significatif ; \*p<0,05

Ces résultats indiquent que le calcium extracellulaire, *via*, entre autres, les canaux Ca<sub>v</sub> est impliqué dans la variation de calcium intracellulaire induite par l'ACh sur les neurones isolés de moustiques AcerKis, mais pas sur les neurones Kis.

Le CdCl<sub>2</sub> n'inhibe pas l'élévation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induite par l'ACh dans les neurones isolés de moustiques Kis et seulement partiellement dans les neurones AcerKis, cela signifie qu'il existe

plusieurs sources de  $\text{Ca}^{2+}$  qui interviennent dans l'effet de l'ACh. Cela est confirmé par un prétraitement de 5 minutes avec la solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium (**cf. Matériels et méthodes, chapitre 2, partie 3.5.**). Dans ces conditions, l'augmentation de calcium intracellulaire induite par l'application d'ACh à 1mM pendant 5 minutes est totalement inhibée sur les neurones isolés des deux souches de moustiques (**Figure 51A, B**).

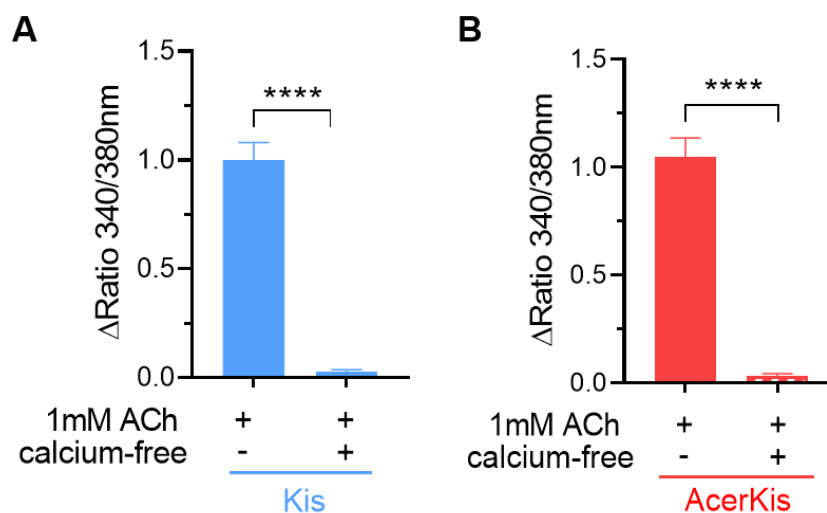


Figure 51 : Histogrammes comparatifs illustrant l'effet sur la variation de calcium de l'application d'ACh à 1mM pendant 5 minutes sur les neurones isolés de moustiques A) Kis et B) AcerKis chargés en Fura-2AM en condition contrôle (n=10-12) et après un prétraitement de 5 minutes avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium « calcium-free » (n=7-20). Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

L'effet du  $\text{CdCl}_2$  observé sur les neurones AcerKis et non sur les neurones Kis peut s'expliquer par le fait que le seuil d'activation des canaux  $\text{Ca}_v$  à haut seuil d'activation (HVA) exprimés par les neurones de moustiques *An. gambiae* (Lavialle-Defaix *et al.*, 2011) peut être atteint plus facilement à cause 1) de l'expression d'une autre population de nAChRs ou, 2) d'une éventuelle surexpression des canaux  $\text{Ca}_v$  eux-mêmes. Il a donc fallu déterminer par RT-qPCR (**cf. Matériels et méthodes, chapitre 2, partie 5.**) le niveau d'expression de la sous-unité alpha des canaux  $\text{Ca}_v$  sur les neurones isolés des deux souches de moustiques.

Les expériences de RT-qPCR menées sur les neurones isolés des moustiques Kis et AcerKis ne montrent pas de différence significative dans l'expression relative des ARNm de ces protéines (gènes de référence : rps7 et actine) (**Figure 52A, B**).

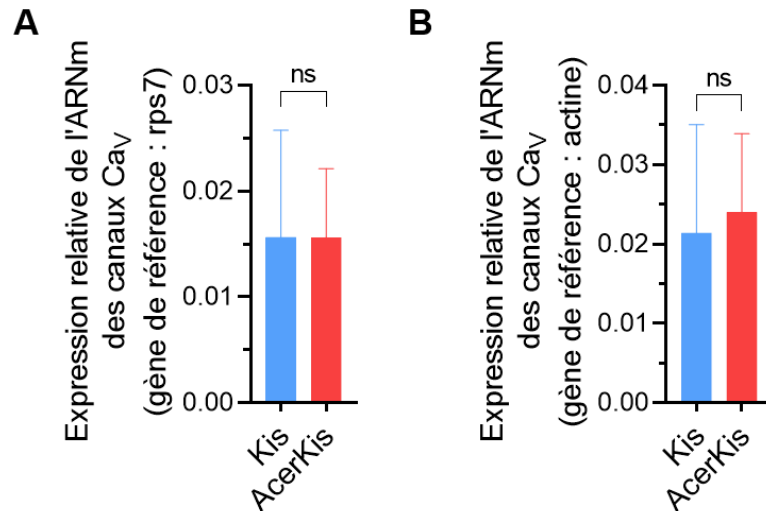


Figure 52 : Histogrammes comparatifs illustrant la quantification par RT-qPCR de l'expression relative des ARNm des canaux Cav par rapport aux gènes de référence A) rps7 (n=4) et B) actine (n=4) sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif.

Il est donc possible d'envisager qu'une dépolarisation plus forte induite par l'expression d'une autre population de nAChRs dans les neurones AcerKis puisse activer les Cav, non sollicités dans les neurones Kis. Afin de vérifier cette hypothèse, l'ACh à 1mM a été testée sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis dans des conditions de courant imposé. Les expériences ont démontré que l'application d'ACh à 1mM induit une dépolarisation transitoire des neurones Kis et AcerKis mais qui est significativement plus importante sur les neurones AcerKis (**Figure 53A, B**).

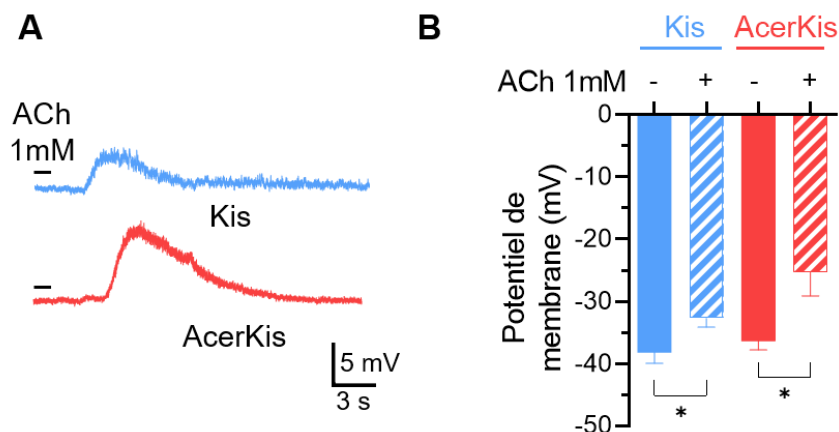


Figure 53 : Dépolarisation induite par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. A) Tracés illustrant la variation de potentiel induite par l'application d'ACh à 1mM pendant 1s enregistrée dans des conditions de courant imposé. B) Histogrammes comparatifs illustrant la dépolarisation moyenne induite par l'application d'ACh à 1mM pendant 1s sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=7) et AcerKis (n=6). Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif ; \* $p < 0,05$ .



Cette dépolarisation plus forte peut permettre d'activer les canaux  $Ca_v$  et pourrait expliquer pourquoi il est observé un effet du  $CdCl_2$  sur les neurones AcerKis et pas sur les neurones Kis. Les expériences suivantes ont donc consisté à déterminer les propriétés d'activation des canaux  $Ca_v$  sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis.

Pour étudier les courants calciques induits par une dépolarisation sur les neurones Kis et AcerKis, un échelon de potentiel dépolarisant de +50mV a été appliqué pendant 10ms à partir du potentiel de référence de -50mV. Des solutions extracellulaires et intrapipettes contenant des agents pharmacologiques permettent d'isoler spécifiquement ces courants (**cf. Matériel et méthodes, chapitre 2, partie 3.3. et 3.5.**). L'application de l'échelon de potentiel génère un courant ionique entrant qui s'inactive partiellement pendant la durée du choc. En accord avec un niveau d'expression identique, l'amplitude moyenne du courant est similaire sur les neurones isolés de moustiques Kis ( $-85,90 \pm 16,83pA$  ;  $n=10$ ) et sur les neurones AcerKis ( $-86,14 \pm 10,28 pA$  ;  $n=10$ ) (**Figure 54A**). L'application de  $CdCl_2$  à  $50\mu M$  pendant 1 minute inhibe totalement le courant observé, confirmant qu'il résulte uniquement de l'activation des canaux  $Ca_v$ .

La dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation des canaux  $Ca_v$  a été étudiée en appliquant différents échelons de potentiels de +10mV à partir du potentiel de référence de -50mV jusqu'à 0mV au maximum. L'amplitude du courant calcique entrant est alors mesurée et la conductance (G) en fonction du potentiel est calculée. La courbe de la dépendance vis-à-vis du potentiel de la conductance normalisée ( $G/G_{max}$ )<sup>11</sup> permet de déterminer le seuil d'activation du courant calcique. Comme illustré dans la **figure 54B**, le décours de la courbe d'activation des canaux  $Ca_v$  est similaire sur les neurones isolés des deux souches de moustiques. Les données électrophysiologiques relatives à la caractérisation des courants calciques sont résumées dans le **tableau 12**. Le seuil d'activation des canaux  $Ca_v$  se situe autour de -25mV. Ce seuil d'activation est atteint par la dépolarisation provoquée par l'ACh sur les neurones isolés de moustiques AcerKis, mais pas sur les neurones Kis.

---

<sup>11</sup> Pour le détail du calcul de la conductance, de la conductance normalisée, voir Perrier *et al.*, 2021 en annexe 2, équations 6.

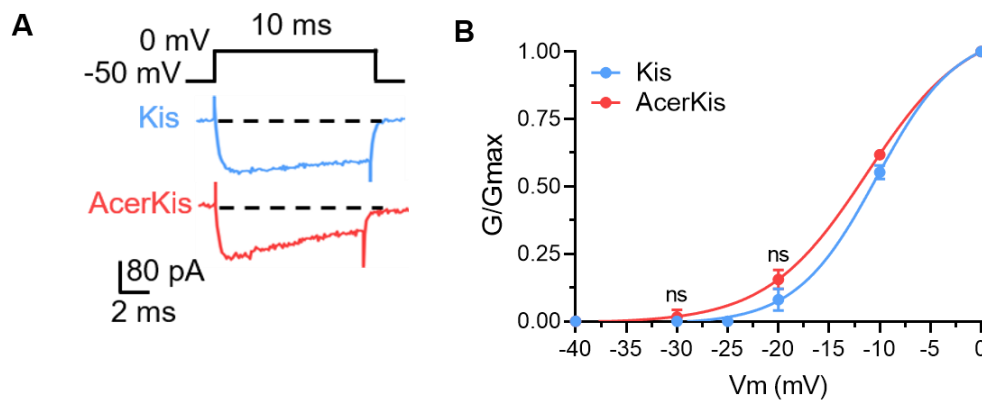


Figure 54 : Caractérisation du courant calcique résultant de l'activation des canaux Cav exprimés par les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. A) Illustration de courants entrants calciques induits par une dépolarisation à l'aide du protocole illustré au-dessus des tracés de courants. B) Courbe d'activation décrite par une équation de Boltzmann<sup>12</sup> des canaux Cav en fonction du potentiel sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=3-5) et AcerKis (n=3-7), Les données sont exprimées avec la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif.

	Neurones Kis	Neurones AcerKis
Amplitude maximale du courant calcique mesurée au pic	-85,9 $\pm$ 18,8pA	-86,1 $\pm$ 11,1pA
Seuil d'activation des canaux Cav	-25mV	-25mV
Potentiel à partir duquel 50% des canaux sont activés (V <sub>0,5</sub> )	-10,3mV	-11,2mV
Pente de la courbe d'activation (k)	4,0mV	4,9mV

Tableau 12 : Données électrophysiologiques issus de la caractérisation des courants calciques résultants de l'activation des canaux Cav sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis.

<sup>12</sup> Pour le détail de l'équation de Boltzmann, voir Perrier *et al.*, 2021 en annexe 2, équation 7.

### 2.2.1.2. Perméabilité au calcium des nAChRs exprimés dans les neurones isolés de moustiques AcerKis

Comme indiqué précédemment, une autre source de calcium responsable d'une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  pourrait être l'expression de nAChRs perméables au calcium (Holt *et al.*, 2002; Mongin *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2005).

Pour tester cette hypothèse, l'ACh a été appliquée par le bain à des concentrations comprises entre 0,1 $\mu$ M et 1mM en présence d'une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium dans des conditions de potentiel imposé à -50mV sur des neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis (**Figure 55A, D**). Un prétraitement de 2 minutes avec la solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium n'a pas d'effet sur l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis (**Figure 55B, C**). Au contraire, sur les neurones isolés de moustiques AcerKis, l'utilisation d'une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium diminue l'amplitude moyenne du courant ACh à 1mM, qui passe de  $-121,1 \pm 30,1$ pA en conditions contrôle à  $-36,1 \pm 8,2$ pA, mais pas à 100 $\mu$ M d'ACh (**Figure 55E, F**). Il est intéressant de noter que lorsqu'on utilise une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium, l'amplitude moyenne du courant ionique entrant généré par l'ACh à 1mM sur les neurones AcerKis n'est pas significativement différente de l'amplitude moyenne du courant ACh à 1mM en conditions contrôle sur les neurones isolés de moustiques Kis (**Figure 55C, F**).

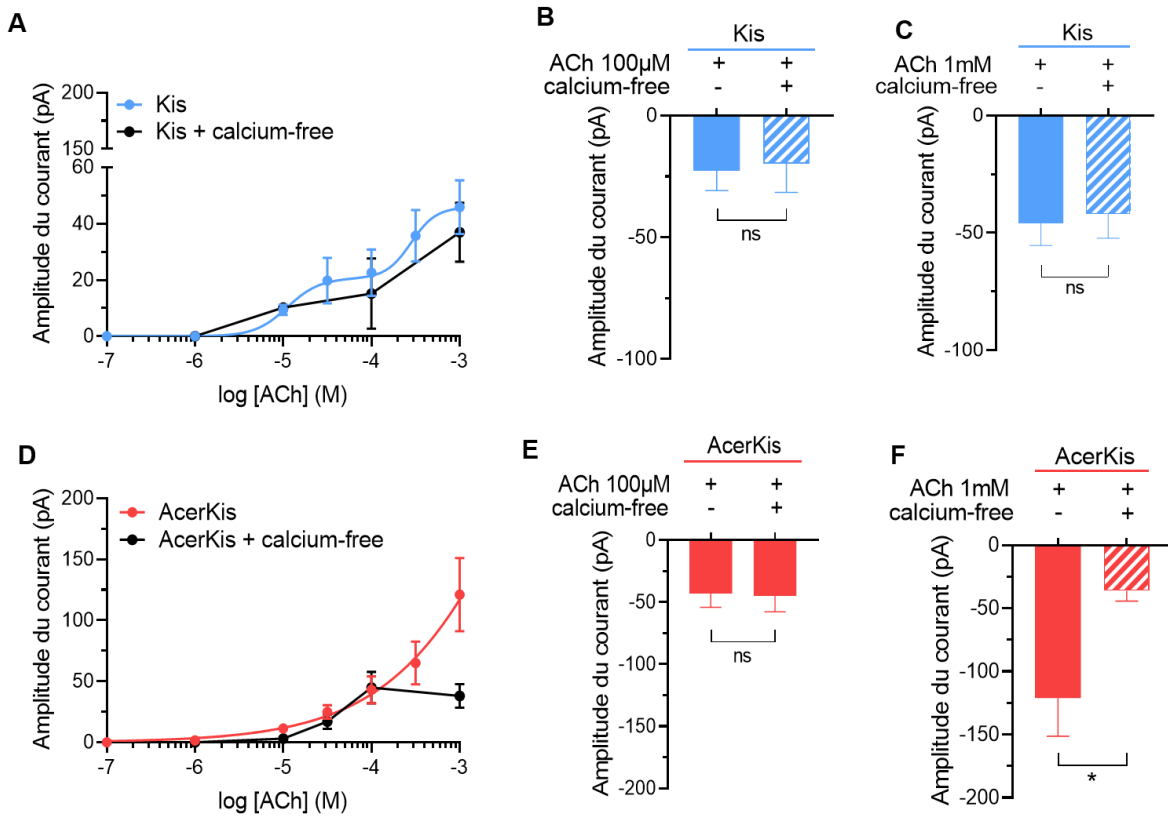


Figure 55 : Etude électrophysiologique de l'implication du calcium extracellulaire dans l'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. A) Courbes effet-log[ACh] obtenues par l'application d'ACh (application de 3s, potentiel de -50mV) dans une gamme de 0,1μM à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis en condition contrôle (n=5-16) et après un prétraitement de 2 minutes avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium (n=5-7). B) Histogrammes comparatifs illustrant l'effet d'un prétraitement de 2 minutes avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium sur l'amplitude moyenne du courant ionique entrant induit par l'ACh à 10μM (n=5) et C) 1mM (n=5) sur des neurones isolés de moustiques Kis. D) Courbes effet-log[ACh] obtenues par l'application d'ACh (application de 3s, potentiel de -50mV) dans une gamme de concentrations comprises entre 0,1μM à 1mM sur les neurones isolés de moustiques AcerKis en condition contrôle (n=3-14) et après un prétraitement de 2 minutes avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium (n=5-8). E) Histogrammes comparatifs illustrant l'effet d'un prétraitement de 2 minutes avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium sur l'amplitude moyenne du courant ionique entrant induit par l'ACh à 10μM (n=8) et F) 1mM (n=5) sur des neurones isolés de moustiques AcerKis. Les données sont exprimées par la moyenne ± S.E.M.. ns : non-significatif ; \* $p < 0,05$ .

Les courbes de dépendance vis-à-vis du potentiel de l'amplitude du courant ionique entrant (I-V) induit par l'ACh à 1mM ont été établies sur les neurones isolés des deux souches en condition contrôle et après un prétraitement de 2 minutes avec la solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium. Le potentiel de membrane à l'état stable a été dépolarisé dans une

gamme de potentiels allant de -70mV à +10mV et l'ACh a été appliquée à 1mM pendant 3s une minute après avoir atteint l'état stable. Les courbes I-V obtenues ont un décours classique pour des nAChRs qui a déjà pu être caractérisé sur neurones d'insecte (Haghighi et Cooper, 1998; Haghighi et Cooper, 2000; Bodereau-Dubois *et al.*, 2012). Le courant ionique entrant présente une forte rectification dans le sens entrant observée dans la gamme de potentiels compris entre -10mV et 10mV.

Sur les neurones isolés des souches Kis et AcerKis, l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh diminue au fur et à mesure que le potentiel de membrane à l'état stable imposé est plus positif. Etonnamment, l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh sur les neurones Kis et AcerKis à -50mV est similaire dans ce protocole de courbe I-V, ce qui n'est pas le cas lors de l'application de l'ACh directement à un potentiel de membrane de -50mV (**Figure 41C**). Un prétraitement de 2 minutes avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium a pour effet de diminuer significativement l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM sur les neurones AcerKis. Cette dernière passe par exemple de  $-97,9 \pm 15,5\text{pA}$  en condition contrôle à  $-27,7 \pm 5,1\text{pA}$  avec la solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium pour un potentiel de membrane de -70mV et de  $-47,4 \pm 8,8\text{pA}$  à  $-6,7 \pm 0,3\text{pA}$  pour un potentiel de membrane de -50mV. Il n'y a pas de différence significative de l'amplitude du courant ionique entrant sur les neurones Kis entre les deux conditions expérimentales (**Figure 56A,B**).

Le potentiel d'inversion, potentiel pour lequel le flux net de charges passant par les nAChRs est égal à zéro, est estimé à +10mV sur les neurones Kis aussi bien en conditions contrôle qu'après un prétraitement avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium (**Figure 56C**). Au contraire, on remarque un décalage de la valeur du potentiel d'inversion estimé du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM sur les neurones AcerKis en conditions calcium-free vers des valeurs plus négatives. Ce dernier est à +10mV en conditions contrôle et à -10mV après un prétraitement avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium (**Figure 56D**). Ces résultats permettent d'affirmer que le courant ionique induit par l'application d'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques AcerKis est en partie porté par le calcium, ce qui n'est pas le cas dans les neurones Kis.

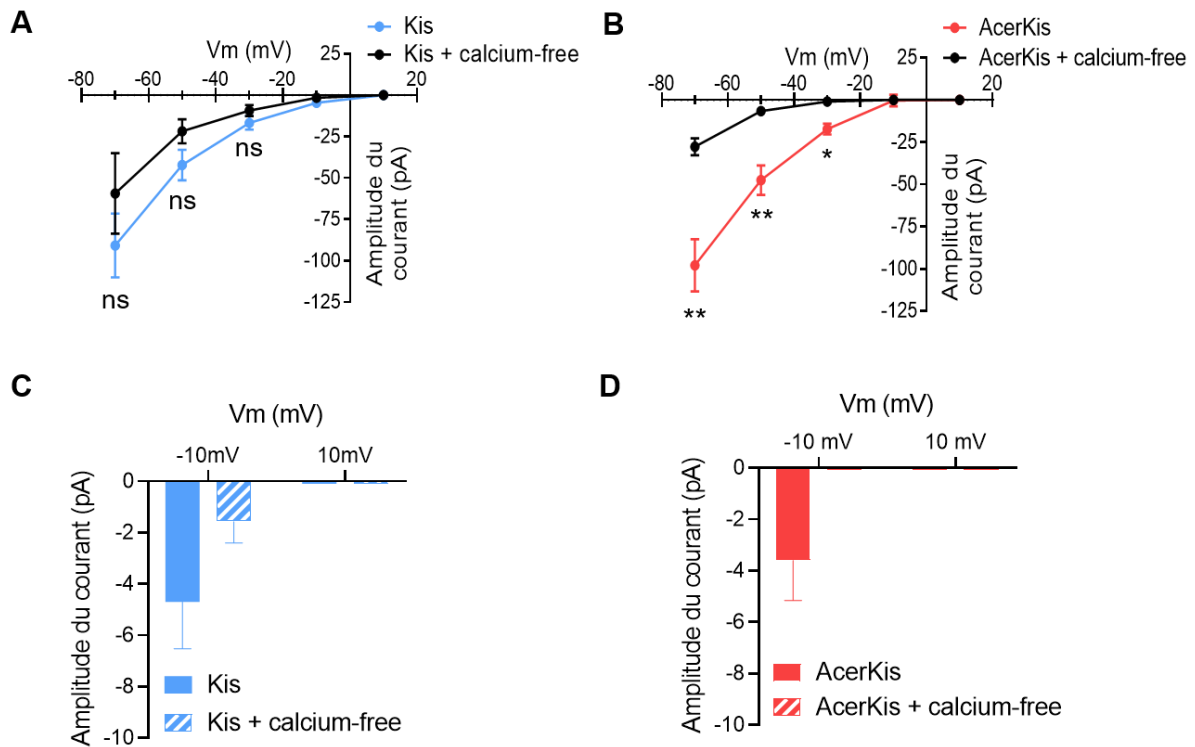


Figure 56 : Etude électrophysiologique de la perméabilité au calcium des nAChRs exprimés par les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. A) Courbes de la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'amplitude du courant ionique entrant (I-V) induit par l'application d'ACh à 1mM pour différents potentiels de référence (application de 3s) en conditions contrôle et après un prétraitement de 2 minutes avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=6-9) et B) AcerKis (n=3-4). C) Histogrammes comparatifs illustrant l'effet d'un prétraitement de 2 minutes avec solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium sur le potentiel d'inversion du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis et D) AcerKis. Les données sont exprimées avec la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif ; \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ .

Les courbes I-V permettent de calculer les conductances moyennes des nAChRs. Ces dernières sont ensuite normalisées pour chaque potentiel testé et dans chaque condition<sup>13</sup>. Le prétraitement avec la solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium n'a pas d'effet sur la conductance moyenne des nAChRs exprimés sur les neurones Kis dans la gamme de potentiels testés (**Figure 57A**). Par contre, sur les neurones AcerKis, le prétraitement a pour effet de diminuer de façon marquée la conductance moyenne en fonction du potentiel (**Figure 57B**).

<sup>13</sup> Pour le détail de la construction des courbes de conductance, voir Perrier *et al.*, 2021 en annexe 2, équations 6 et 7.

Cette dernière passe de 0,59 à 0,34 pour un potentiel de membrane de -50mV (diminution d'environ 43%) et de 0,32 à 0,11 pour un potentiel de membrane de -30mV (diminution d'environ 68%). Cela est en accord avec une participation du calcium dans l'établissement du courant ionique induit par l'ACh sur les neurones AcerKis mais pas sur les neurones Kis.

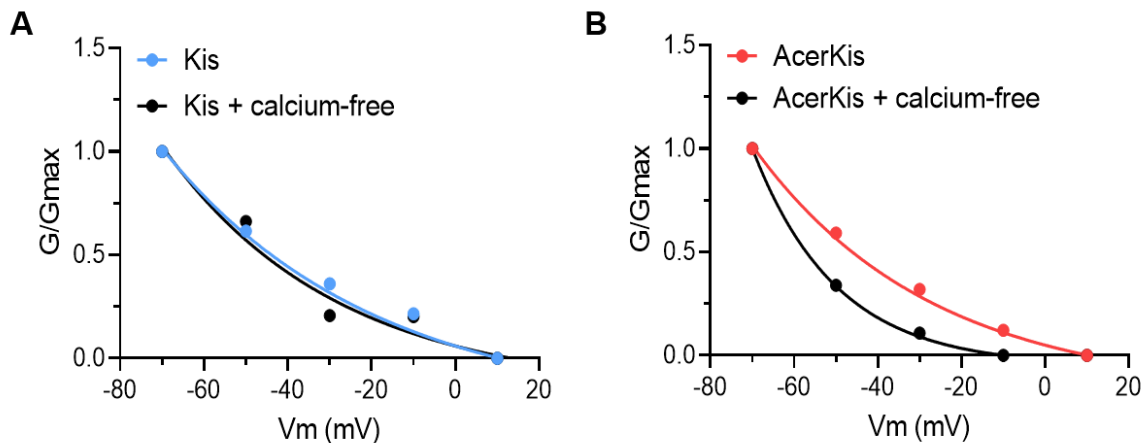


Figure 57 : Influence du calcium extracellulaire sur la conductance des nAChRs exprimés par les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. A) Courbes représentatives de la conductance moyenne normalisée en fonction du potentiel des nAChRs en conditions contrôle et après un prétraitement de 2 minutes avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium sur les neurones isolés de moustiques Kis et B) AcerKis. Les données sont exprimées avec la moyenne.

La population de nAChRs surexprimés sur les neurones isolés de moustiques AcerKis est donc perméable au calcium, mais pas les nAChRs exprimés sur les neurones Kis. Les mécanismes impliqués dans l'élévation de la concentration dans les neurones isolés de moustiques Kis détectée avec la technique de l'imagerie calcique peuvent être nombreux et n'ont pas été étudiés plus profondément.

### 2.2.2. La nicotine permet-elle de discriminer les nAChRs exprimés par les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ?

Dans le but de discriminer encore plus précisément les différents types de nAChRs exprimés dans les neurones isolés de moustique Kis et AcerKis, l'effet d'un agoniste cholinergique, la nicotine a été étudiée à une concentration de 100 $\mu$ M en condition de potentiel imposé à -50mV.

Les résultats préliminaires obtenus montrent que la nicotine à 100µM induit un courant ionique entrant dont l'amplitude est très inférieure à celle du courant induit par l'ACh à la même concentration sur les neurones isolés des deux souches (**Figure 58A**). Sur les neurones Kis, l'amplitude du courant induit par la nicotine à 100µM est en moyenne de  $-5,9 \pm 1,9\text{pA}$  contre  $-22,6 \pm 8,2\text{pA}$  pour l'ACh à 100µM. Sur les neurones AcerKis, l'amplitude du courant induit par la nicotine à 100µM est en moyenne de  $-6,1 \pm 2,5\text{pA}$  contre  $-44,6 \pm 13,4\text{pA}$  pour l'ACh à 100µM (**Figure 58B**).

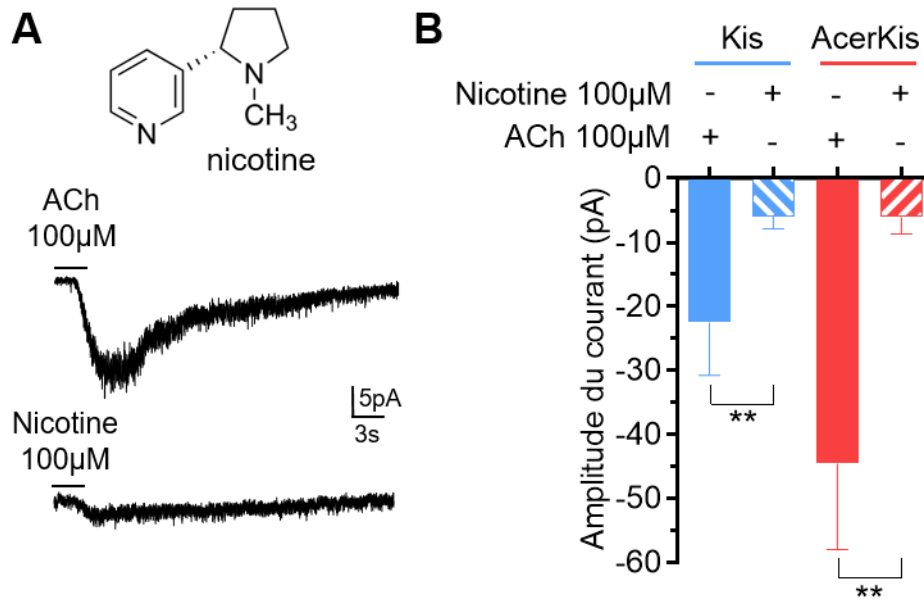


Figure 58 : Etude de l'effet de la nicotine à 100µM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. A) Représentation de la structure chimique de la nicotine et illustrations de courants entrants induits par l'ACh et la nicotine à 100µM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. B) Histogrammes comparatifs illustrant l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh et par la nicotine à 100µM (application de 3s, potentiel de -50mV) sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=11-14) et AcerKis (n=5-8). Données exprimées par la moyenne ± S.E.M.. \*\* $p < 0,01$ .

L'effet de la nicotine est très étonnant sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis dans la mesure où l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'application de cette molécule à 100µM est similaire entre les neurones isolés des deux souches et qu'elle agit beaucoup moins bien que l'ACh. La nicotine ne permet pas de discriminer les nAChRs exprimés par les neurones isolés Kis et AcerKis.

Puisque l'effet de la nicotine est plus faible que celui de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis, l'effet de l' $\alpha$ -bgt à 100nM a été testé sur le courant ionique entrant induit par la nicotine à 100µM sur les neurones isolés de moustiques Kis. A cette concentration,



l' $\alpha$ -bgt n'est pas capable d'inhiber le courant induit par l'application de nicotine à 100 $\mu$ M (**Figure 59A**). De plus, l'application simultanée d'ACh et de nicotine à 100 $\mu$ M semble induire un courant ionique entrant dont l'amplitude n'est pas significativement plus importante que celle du courant induit par l'ACh seule (**Figure 59B**).

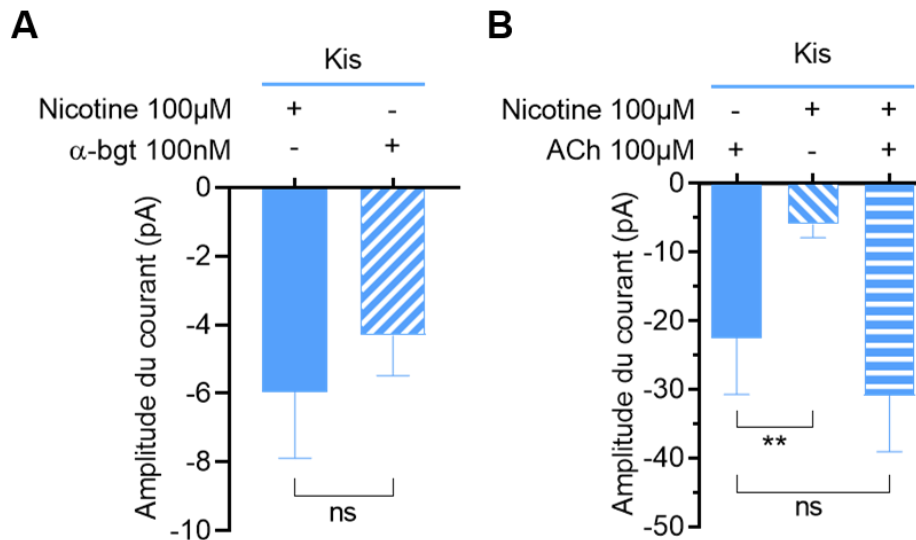


Figure 59 : Effet de l' $\alpha$ -bgt sur le courant ionique entrant induit par la nicotine sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. A) Histogrammes comparatifs illustrant l'amplitude du courant ionique entrant induit par la nicotine à 100 $\mu$ M (application de 3s, potentiel de -50mV) après un prétraitement de 2 minutes avec l' $\alpha$ -bgt à 100nM. B) Histogrammes comparatifs illustrant l'effet de l'application d'ACh et de nicotine 100 $\mu$ M séparément et simultanément sur l'amplitude du courant. Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif ; \*\* $p < 0,01$ .

La différence d'effet entre la nicotine et l'ACh ainsi que l'absence d'effet de l' $\alpha$ -bgt sur le courant ionique entrant induit par la nicotine peuvent s'expliquer par plusieurs hypothèses: 1) la nicotine a une affinité plus faible que l'ACh pour les nAChRs exprimés sur les neurones isolés des deux souches, 2) les deux agonistes se fixent sur des sites différents au niveau des nAChRs, et, 3) l'effet de la nicotine est régulé par le calcium intracellulaire sur les neurones isolés des deux souches (Thany *et al.*, 2008; Bodereau-Dubois *et al.*, 2012; Morales-Perez *et al.*, 2016).

### 3. Influence de la mutation *kdr* sur les propriétés électropharmacologiques des neurones de moustiques KdrKis

L'origine de la différence d'effet de l'ACh à faible concentration (30 $\mu$ M) sur les neurones isolés de moustique KdrKis portant la mutation L1014F comparé aux neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis a été investiguée. Sur la souche KdrKis, résistante aux pyréthriinoïdes, la mutation se situe sur le domaine II du segment S6 de la sous-unité alpha du canal sodium dépendant du potentiel ( $Na_v$ ), qui est responsable de la genèse de l'influx nerveux. Contrairement à la souche AcerKis, la mutation n'affecte pas le système cholinergique, il est donc surprenant que l'ACh agisse de manière différente entre les neurones Kis et KdrKis (**Figure 43B**).

Nos études se sont donc portées dans un premier temps sur le courant entrant sodium généré suite à l'activation des canaux  $Na_v$  pour tenter d'établir un lien entre les modifications éventuelles des propriétés biophysiques de ces canaux ioniques et l'augmentation de l'efficacité de l'ACh à faible concentration sur les neurones KdrKis.

#### 3.1. Caractérisation des propriétés biophysiques des $Na_v$ des neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis

Une première étude électrophysiologique comparative sur les propriétés biophysiques des canaux  $Na_v$  entre les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis a été menée avec la technique du patch-clamp en condition de potentiel imposé. Le courant sodium est étudié en appliquant des échelons de potentiel dépolarisants de +10mV et d'une durée de 4ms à partir d'un potentiel de référence de -90mV. Pour isoler ces courants, les solutions extracellulaires et intrapipettes contiennent des agents pharmacologiques spécifiques (**cf. Matériel et méthodes, chapitre 2, partie 3.3. et 3.5.**).

Un exemple représentatif de ce courant sodium, obtenu sur des neurones isolés des souches Kis et KdrKis est illustré dans la **figure 60**. Le courant entrant sodium présente une phase d'activation (1) et une phase d'inactivation maintenue (2) pendant toute la durée du choc sur les neurones des deux souches de moustiques. Il faut noter que ce courant sodium est totalement bloqué par l'application de TTX (Lavialle-Defaix et al., 2011).

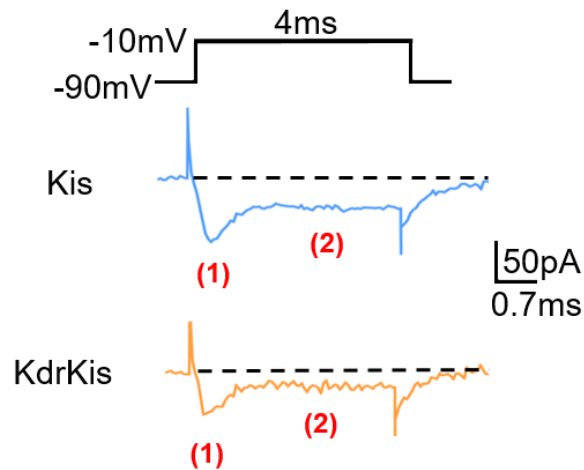


Figure 60 : Illustration d'un courant sodique induit par une dépolarisation sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis à l'aide du protocole de potentiel imposé représenté au-dessus des courants. (1) phase d'activation, (2) phase d'inactivation maintenue.

### 3.1.1. Propriétés biophysiques de la phase d'activation du courant sodique

#### 3.1.1.1. Dépendance vis-à-vis du potentiel de l'amplitude de la phase d'activation du courant sodique des neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis

La dépendance vis-à-vis du potentiel de l'amplitude du courant sodique mesurée au pic a été étudiée. Plusieurs échelons de potentiel de +10mV de 4ms ont été appliqués successivement dans une gamme de -90mV à +20mV. L'amplitude moyenne des courants sodiques générés en fonction du potentiel est illustrée en **figure 61A et B**.

Dans les neurones de moustiques isolés des deux souches, le courant sodique apparaît à un potentiel de membrane de -60mV, puis l'amplitude du courant augmente pour atteindre un maximum à -10mV sur les neurones KdrKis et 0mV sur les neurones Kis. L'amplitude maximale du courant sodique est cependant plus faible dans les neurones isolés de moustiques KdrKis ( $-77,5 \pm 10,7\text{pA}$  à  $-10\text{mV}$ ) que dans les neurones Kis ( $-107,1 \pm 13,2 \text{ pA}$  à  $0\text{mV}$ ). Pour des potentiels plus positifs, l'amplitude du courant sodique diminue progressivement jusqu'à un potentiel d'inversion extrapolé à +65mV. Cette valeur est très proche du potentiel d'équilibre de l'ion sodique calculé dans nos conditions expérimentales (+73,6mV) grâce à l'équation de Nernst. Cela signifie que le sodium est bien l'ion responsable du courant ionique enregistré.

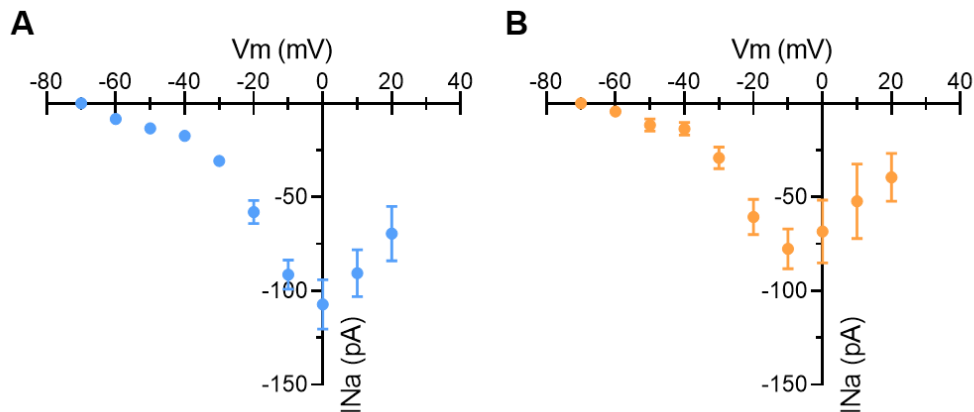


Figure 61 : Etude de la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'amplitude de la phase d'activation du courant sodique du canal Nav dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. A) Amplitude moyenne du courant entrant sodique (INa) en fonction du potentiel de membrane (Vm) sur neurones isolés de moustiques Kis (n=6-7) et B) KdrKis (n=6-7). Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M..

### 3.1.1.2. Dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation et de l'inactivation à l'état stable du courant sodique des neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis

En se basant sur ces courbes I-V, les propriétés d'activation et d'inactivation du courant entrant sodique ont été étudiées. La conductance ionique (G) a été calculée à partir de l'amplitude du courant pour un potentiel donné puis a été normalisée ( $G/G_{max}$ ) pour étudier la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation du courant<sup>14</sup>. Les courbes d'activation obtenues sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis présentent un aspect biphasique atypique avec un premier plateau entre -50 et -40mV avant d'atteindre un maximum à +10mV (**Figure 62A, B**). Ces équations sont décrites par une double équation de Boltzmann<sup>15</sup>. Les paramètres électrophysiologiques associés aux courbes d'activation des canaux Nav sont résumés dans le **tableau 13**. Le potentiel de demi-activation et la pente de la courbe d'activation de la première partie de la courbe d'activation du courant sodique est similaire dans une gamme de potentiels comprise entre -80 et -40mV sur les neurones Kis et KdrKis.

<sup>14</sup> Pour le détail du calcul de la conductance ionique brute et normalisée, ainsi que le fit de la courbe d'activation, voir Perrier *et al.*, 2021 en annexe 2, équation 6 et 7.

<sup>15</sup> Pour le détail de la double équation de Boltzmann, voir Perrier *et al.*, 2021 en annexe 2, équation 8.

La dépendance vis-à-vis du potentiel de l'inactivation à l'état stable du canal sodium quant à elle est étudiée avec la technique de la double impulsion (impulsion conditionnante puis impulsion test). L'amplitude du courant sodium ( $I$ ) a été mesurée au pic pour chaque impulsion conditionnante puis normalisée ( $I/I_{max}$ )<sup>16</sup>. L'impulsion conditionnante a été appliquée pendant 500ms dans une gamme de potentiel comprise entre -110mV à +20mV avec des incréments de 10mV à partir d'un potentiel de référence de -110mV. Le potentiel de membrane est ensuite de nouveau imposé à -90mV pendant 1ms. Une impulsion test a été finalement appliquée pendant 15ms jusqu'à -10mV. L'amplitude du courant sodium mesurée au pic après l'impulsion test diminue au fur et à mesure que l'impulsion conditionnante est de plus en plus positive, indiquant que de moins en moins de canaux sont activables (**Figure 62A, B**). Les paramètres électrophysiologiques associés aux courbes d'inactivation à l'état stable sont résumés dans le **tableau 13**.

La superposition des courbes d'activation et d'inactivation révèle que les canaux  $Na_v$  ont des propriétés d'activation et d'inactivation en fonction du potentiel différentes entre les neurones Kis et KdrKis. En effet, même si la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'inactivation n'est pas significativement différente entre les canaux sodiques exprimés par les neurones Kis et KdrKis, la courbe de dépendance vis-à-vis du potentiel l'inactivation est incomplète sur les neurones KdrKis pour des potentiels plus positifs, ce qui se traduit par un changement de la pente de la courbe d'inactivation ( $k$ ) (**Tableau 13**). L'inactivation incomplète des canaux  $Na_v$  sur les neurones KdrKis cause une augmentation de la taille de la fenêtre de potentiels dans laquelle les canaux  $Na_v$  conduisent à l'état stable dans les neurones KdrKis. Les courbes d'activation et d'inactivation se croisent à un potentiel de -30mV sur les neurones isolés de moustiques Kis alors qu'elles se croisent à -25mV sur les neurones KdrKis (**Figure 62C**).

---

<sup>16</sup> Pour le détail du calcul et du fit de la courbe d'inactivation à l'état stable, voir Perrier *et al.*, 2021, équation 8 et 9.

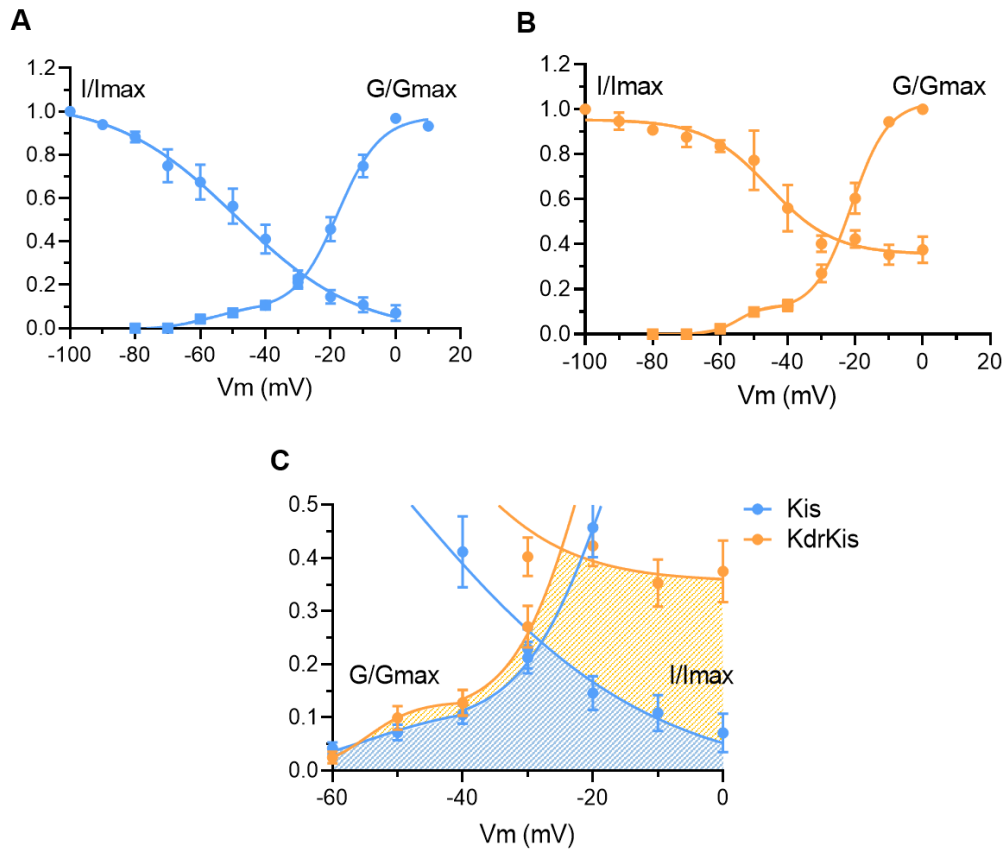


Figure 62 : Etude électrophysiologiques des propriétés d'activation et d'inactivation à l'état stable des canaux Nav dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. A) Dépendance vis-à-vis du potentiel (Vm) de la conductance normalisée ( $G/G_{max}$ ) et de l'inactivation à l'état stable ( $I/I_{max}$ ) des canaux Nav sur les neurones isolés de moustiques Kis ( $n=7-8$ ) et B) KdrKis ( $n=4-6$ ). Les courbes d'activation sont décrites par une double équation de Boltzmann. C) Agrandissement de la gamme de potentiels dans laquelle les courbes d'activation et d'inactivation à l'état stable se superposent sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. Les aires sous les courbes (bleu pour Kis ; orange pour KdrKis) représentent le courant de fenêtre qui traduit la gamme de potentiel dans laquelle les canaux Nav conduisent à l'état stable. Les données sont exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M..

Paramètres électrophysiologiques		Neurones Kis	Neurones KdrKis
Activation	$V_{0,51}$ (mV)	$-55,49 \pm 1,99$ (n=8-10)	$-55,73 \pm 1,78$ (n=5-7)
	k1 (mV)	$6,71 \pm 0,84$ (n=8-10)	$5,73 \pm 1,64$ (n=5-7)
	$V_{0,52}$ (mV)	$-16,68 \pm 1,86$ (n=8-10)	$-21,31 \pm 1,62$ (n=5-7)
	k2 (mV)	$5,78 \pm 0,56$ (n=8-10)	$4,11 \pm 0,64$ (n=5-7)
Inactivation	$V_{0,5}$ (mV)	$-48,50 \pm 3,55$ (n=5-8)	$-46,99 \pm 4,40$ (n=2-4)
	k (mV)	$10,56 \pm 1,07$ (n=5-8)	$14,87 \pm 1,88$ (n=2-4)

Tableau 13 : Dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation et de l'inactivation des courants sodiques dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. Les données sont exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M..  $V_{0,5}$  : potentiel de demi-activation ou de demi-inactivation ; k : pente de la courbe. Les numéros 1 et 2 associés aux paramètres électrophysiologiques de l'activation du courant sodium correspondent à la première et à la deuxième phase de la courbe d'activation de la double équation de Boltzmann qui décrit le décours des courbes en figure 68A et B.

### 3.1.2. Propriétés biophysiques du courant sodique maintenu en fin d'impulsion dépolarisante

Pour tenter de déterminer si plusieurs populations de canaux  $N_{av}$  sont impliqués dans l'établissement du courant sodium dans les neurones Kis et KdrKis, les propriétés biophysiques de la phase maintenue du courant sodium maintenu ont aussi été étudiées. Les **figures 63A et B** illustrent l'amplitude du courant mesurée à la fin du choc dépolarisant (**Figure 60**) en fonction du potentiel sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. Le seuil d'activation de la phase maintenue du courant sodium est situé autour de -60mV sur les neurones isolés des souches Kis et KdrKis puis l'amplitude du courant augmente fortement pour atteindre un maximum à -20mV sur les neurones KdrKis et -10mV sur les neurones Kis. L'amplitude maximale du courant sodium maintenu n'est pas significativement différente entre les neurones isolés de moustiques KdrKis ( $-27,6 \pm 5,2$ pA à -20mV) et ceux des moustiques Kis ( $-23,6 \pm 5,7$ pA à -10mV). Pour des potentiels plus positifs, l'amplitude du courant sodium diminue progressivement.

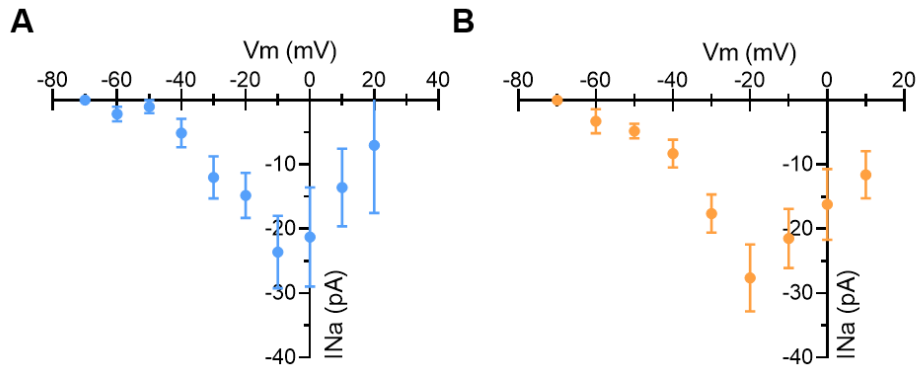


Figure 63 : Etude de la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'amplitude de la phase maintenue du courant sodique du canal Nav dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. A) Dépendance vis-à-vis du potentiel de l'amplitude du courant sodium ( $I_{Na}$ -Vm) mesurée à la fin du choc dépolarisant sur les neurones isolés de moustiques Kis ( $n=6-7$ ) et B) KdrKis ( $n=6-7$ ). Les données sont exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M..

La conductance ionique ( $G$ ) du courant sodium maintenu est calculée à partir de l'amplitude de ce courant pour un potentiel donné et est normalisée ( $G/G_{max}$ ). La conductance normalisée du courant sodium maintenu est représentée en proportion de la conductance totale (**Figure 64A, B**). La conductance du courant sodium maintenu compte pour environ 12% de la conductance maximale totale sur les neurones isolés de moustiques Kis et pour environ 13% sur les neurones KdrKis. Les paramètres électrophysiologiques associés aux courbes d'activation de la phase maintenue du courant sodique sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis sont résumés dans le **tableau 14**.

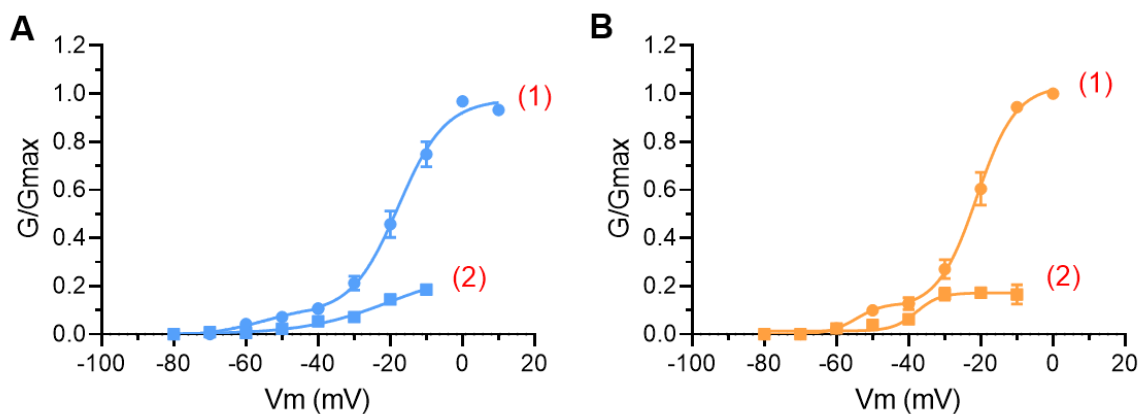


Figure 64 : Etude électrophysiologique des propriétés d'activation de la phase maintenue du courant sodique dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. A) Courbes de conductances normalisées du courant au pic (1) et du courant maintenu (2) sur neurones isolés de moustiques Kis ( $n=5-10$ ) et B) KdrKis ( $n=5-6$ ). Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  S.E.M..



Paramètre électrophysiologique	Neurones Kis		Neurones KdrKis	
	Première phase d'activation du courant sodium	Phase maintenue du courant sodium	Première phase d'activation du courant sodium	Phase maintenue du courant sodium
$V_{0,5}$ (mV)	-55,4	-20,3	-55,7	-37,8
k (mV)	6,71	11,8	5,7	3,2
Proportion de la conductance maximale totale (%)	12	22	13	17

Tableau 14 : Dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation de la première phase de la courbe d'activation mesurée au pic (courbes (1) sur la figure 64) du courant sodium et de la phase maintenue du courant sodium (courbes (2) sur la figure 64) dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. Les données sont exprimées par la moyenne.  $V_{0,5}$  : potentiel de demi-activation ou de demi-inactivation ; k : pente de la courbe.

Il est intéressant de noter que le premier plateau des courbes d'activation du courant mesuré au pic compte pour environ 10 à 20% de la conductance maximale totale et pourrait donc correspondre à la phase d'activation du courant maintenu mesuré à la fin du choc dépolarisant.

En dehors de toutes autres considérations, ces résultats pourraient suggérer l'existence de 2 types de canaux  $Na_v$  définis par des propriétés de conductances et de dépendance vis-à-vis du potentiel différentes (Rush *et al.*, 1998), dont un type participerait plutôt au pic du courant sodium et l'autre au courant maintenu. Il n'a pas pour l'instant été possible de préciser si deux populations de canaux sodium co-existent.

## 3.2. Influence de la concentration basale en calcium sur les neurones isolés de moustiques KdrKis

### 3.2.1. Détermination du potentiel de membrane dans les neurones isolés de moustiques KdrKis

L'augmentation de la fenêtre de potentiels dans laquelle les canaux  $Na_V$  conduisent à l'état stable sur les neurones isolés de moustiques KdrKis suggère que le potentiel de membrane au repos est plus dépolarisé que dans les neurones Kis (**Figure 62**).

Pour vérifier cette hypothèse, le potentiel de membrane au repos a été mesuré avec la technique du patch-clamp en conditions de courant imposé. Cette expérience confirme que le potentiel de membrane au repos est plus positif sur les neurones isolés de moustiques KdrKis ( $-33,2 \pm 1,7\text{mV}$ ) que sur les neurones Kis ( $-47,8 \pm 1,9\text{mV}$ ) (**Figure 65**).

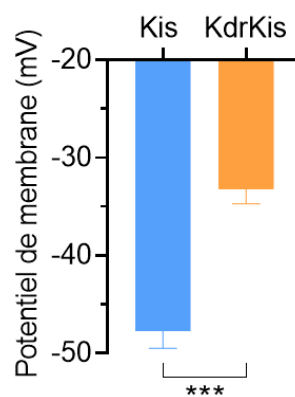


Figure 65 : Histogrammes comparatifs illustrant la valeur du potentiel de membrane au repos dans des conditions de courant imposé sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=8) et KdrKis (n=4). Les données sont exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. \*\*\* $p < 0,001$ .

Dans notre contexte, nous voulons établir un lien entre la modification des propriétés biophysiques des canaux  $Na_V$  et l'augmentation de l'efficacité de l'ACh à faible concentration ( $30\mu\text{M}$ ) sur les nAChRs dans les neurones isolés de moustiques KdrKis (**Figure 43B**). La dépolarisation du potentiel au repos dans les neurones peut avoir un impact sur les propriétés fonctionnelles des canaux ioniques dépendants du potentiel. Or, il est connu que les canaux  $Ca_V$  sont impliqués dans la modulation de l'activité des nAChRs *via* le calcium comme évoqué précédemment mais aussi dans la sécrétion de l'ACh au niveau présynaptique (Dolphin et Lee, 2020). Comme les propriétés d'inactivations à l'état stable des canaux  $Na_V$  sont modifiées dans

les neurones KdrKis, il est possible que cela impacte les propriétés fonctionnelles des canaux  $Ca_v$  qui sont impliqués dans la sécrétion d'ACh. Dans les neurones KdrKis, une diminution du nombre de canaux  $Ca_v$  activables qui induit une diminution de la sécrétion d'ACh serait cohérente avec l'augmentation de l'efficacité de ce neurotransmetteur sur les nAChRs que nous avons observé. Il serait alors logique que nous observions des modifications dans le système cholinergique qui compensent une diminution de la sécrétion d'ACh dans la fente synaptique.

### 3.2.2. Influence du potentiel de membrane sur les propriétés biophysiques des canaux calciques dépendants du potentiel dans les neurones isolés de moustiques KdrKis

Les propriétés d'inactivation à l'état stable des canaux  $Ca_v$  sont étudiées en condition de potentiel imposé avec la technique de la double impulsion présentée précédemment. Des échelons de potentiels conditionnants de 200ms dans une gamme de -70 à +10mV sont appliqués avec des incréments de 10mV sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. Le potentiel de membrane est ensuite imposé à la valeur du potentiel de référence de -50mV pendant 5ms avant l'application d'une impulsion test de 10ms jusqu'à 0mV. L'amplitude du courant ( $I$ ) résultant de l'activation des courants calciques est mesurée au pic puis normalisée par rapport à l'amplitude maximale mesurée au pic à -70mV ( $I/I_{max}$ ). Pour isoler ces courants, les solutions extracellulaires et intrapipettes contiennent des agents pharmacologiques spécifiques (**cf. Matériel et méthodes, chapitre 2, partie 3.3. et 3.5.**).

Grâce à la courbe d'inactivation à l'état stable des canaux  $Ca_v$ , une diminution de l'amplitude du courant est observée à mesure que la valeur de potentiel de l'impulsion conditionnante est plus positive sur les neurones isolés des deux souches (**Figure 66**). La mutation L1014F ne semble pas influencer de manière indirecte les propriétés d'inactivation à l'état stable des canaux  $Ca_v$ . Il est intéressant de noter qu'à la valeur du potentiel de repos mesurée en condition de courant imposé sur les neurones isolés de moustiques KdrKis ( $-33,2 \pm 1,7\text{mV}$ ), seulement 80% des canaux  $Ca_v$  sont dans un état activable. Par contre, sur les neurones Kis, 100% des canaux  $Ca_v$  sont dans un état activable à la valeur mesurée du potentiel de repos ( $-47,8 \pm 1,9\text{mV}$ ).

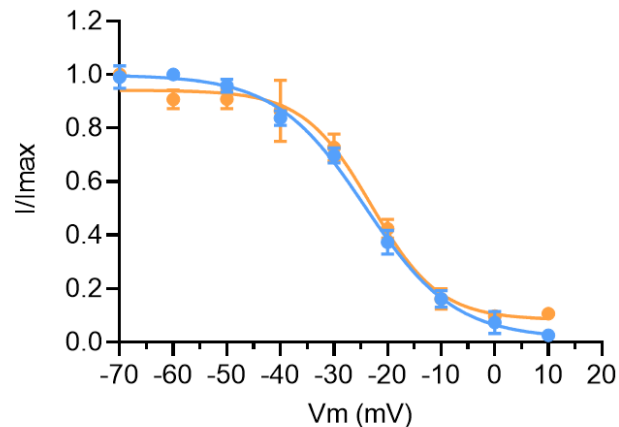


Figure 66 : Dépendance vis-à-vis du potentiel ( $V_m$ ) de l'inactivation à l'état stable ( $I/I_{max}$ ) des canaux  $Ca_V$  sur les neurones isolés de moustiques A) Kis, en bleu ( $n=7$ ), et B) KdrKis, en orange ( $n=4$ ).

### 3.2.3. Influence de la concentration basale en calcium sur le courant induit par l'ACh dans les neurones isolés de moustiques KdrKis

Comme le nombre de canaux  $Ca_V$  qui sont dans un état activable est plus faible dans les neurones isolés de moustique KdrKis, l'influx calcique est moins important que sur les neurones de la souche sensible lors d'une dépolarisation. Cela influence certainement la  $[Ca^{2+}]_i$  basale dans les neurones isolés de la souche KdrKis.

Avec la technique d'imagerie calcique, le niveau de calcium intracellulaire basal a été mesuré et comparé dans des neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis chargés avec la sonde Fura-2AM. Une diminution significative de la  $[Ca^{2+}]_i$  de base est observée dans les neurones KdrKis (**Figure 67A**). Le ratio 340/380nm de base est de  $0,34 \pm 0,07$  dans les neurones Kis contre  $0,21 \pm 0,01$  dans les neurones KdrKis, ce qui représente une réduction de 39%.

Comme l'effet de l'ACh à faible concentration est différent entre les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis, la  $[Ca^{2+}]_i$  basale a été diminuée dans les neurones Kis lors de nos expérimentations suivantes pour vérifier si la diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  basale dans les neurones KdrKis est responsable de l'augmentation de l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh à  $30\mu M$ . La concentration en  $CaCl_2$  contenu dans le liquide intrapipette a donc été diminuée de  $0,1\mu M$  à  $0,01\mu M$ . L'amplitude du courant induit par l'ACh sur les neurones Kis dans ces conditions n'est pas significativement différente de celle qui est observée sur les neurones KdrKis en conditions contrôle (**Figure 67B**).

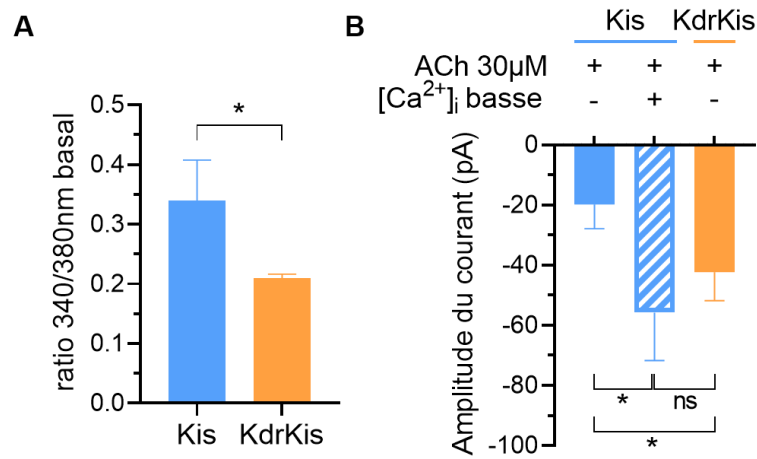


Figure 67 : Influence de la  $[Ca^{2+}]_i$  basale sur l'amplitude du courant ionique induit par l'ACh à faible concentration. A) Histogrammes comparatifs illustrant le niveau de calcium intracellulaire de base dans les neurones isolés de moustiques Kis (n=11) et KdrKis (n=36) chargés en Fura-2AM. B) Histogrammes comparatifs illustrant l'amplitude du courant induit par l'ACh (application de 3s, potentiel de -50mV) dans les neurones Kis (n=5) et KdrKis (n=12) en condition contrôle (0,1µM  $CaCl_2$  dans la solution intrapipette) et, uniquement sur les neurones Kis, en utilisant une solution intrapipette appauvrie en calcium (0,01µM  $CaCl_2$ ) (n=9). La valeur du ratio 340/380nm est mesurée au maximum. Les données sont exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif ; \* $p < 0,05$ .

Nous pouvons conclure que la diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  basale est responsable d'une augmentation de l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh à faible concentration sur les neurones KdrKis.

## Chapitre 2 : Effets des insecticides de type néonicotinoïdes et mésoioniques qui agissent sur les récepteurs nicotiques des neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

Nous avons montré qu'il existait une population différente de nAChRs dans les neurones AcerKis et une augmentation de l'efficacité de l'ACh sur les nAChRs exprimés par les neurones KdrKis en comparaison avec les moustiques sensibles Kis. Dans l'optique de développer des stratégies de lutte basées sur l'utilisation d'insecticides qui agissent sur les nAChRs, nous avons étudié dans quelle mesure ces modifications du système cholinergique peuvent influencer les effets des insecticides sur les neurones isolés de moustiques sensibles et résistants. La clothianidine (néonicotinoïde, agoniste spécifique des nAChRs, Casida 2018) et le triflumézopyrime (mésoionique, antagoniste compétitif spécifique des nAChRs, Cordova, 2016) ont été testés.

### 1. Effet de la clothianidine sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

#### 1.1. Caractérisation du courant ionique entrant induit par la clothianidine sur les neurones isolés de moustique Kis, AcerKis et KdrKis

L'effet de la clothianidine (CLO) à 100 $\mu$ M a été étudié avec la technique du patch-clamp en conditions de potentiel imposé à -50mV. La clothianidine (**Figure 68A**) a été appliquée par le bain pendant 3s directement sur le corps cellulaire de neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.

L'application de la CLO à 100 $\mu$ M induit un courant ionique entrant transitoire avec une première phase rapide qui permet d'atteindre le maximum de l'amplitude et une phase d'inactivation biphasique sur les neurones isolés des 3 souches de moustiques (**Figure 68B**). L'amplitude moyenne du courant ionique entrant n'est pas significativement différente entre les neurones isolés des trois souches. Sur les neurones isolés de moustiques Kis, l'amplitude du

courant ionique entrant induit par la clothianidine est de  $-19,1 \pm 6,3\text{pA}$  alors qu'elle est de  $-29,4 \pm 12,3\text{pA}$  sur les neurones AcerKis et de  $-13,7 \pm 3,7\text{pA}$  sur les neurones KdrKis (**Figure 68C**).

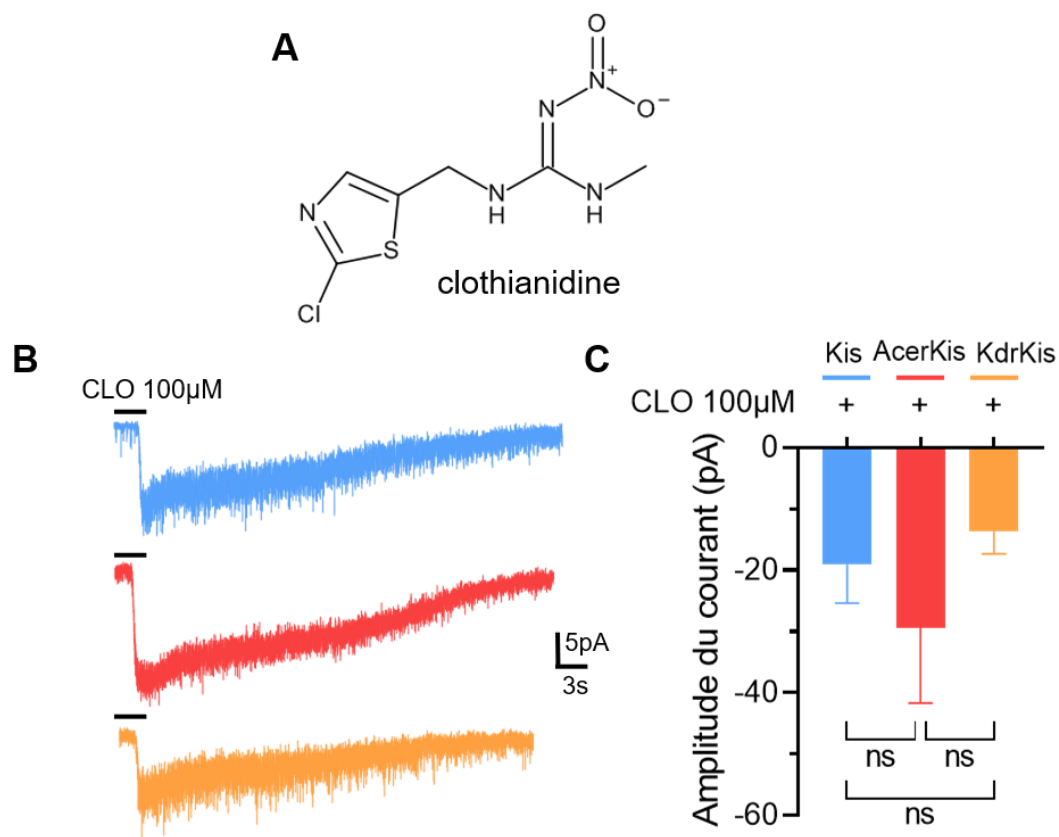


Figure 68 : Effet de la CLO à 100µM sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. A) Représentation de la structure chimique de la clothianidine. B) Exemples du déroulement du courant ionique entrant induit par la CLO à 100µM (application de 3s, potentiel de référence -50mV) sur les neurones isolés de moustiques Kis, KdrKis et AcerKis. C) Histogrammes comparatifs illustrant l'amplitude du courant ionique entrant mesurée au pic induit par la CLO à 100µM sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=6), AcerKis (n=5) et KdrKis (n=3). Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif

## 1.2. Dépendance vis-à-vis de la concentration de l'amplitude du courant induit par la clothianidine dans les neurones isolés de moustiques Kis

La dépendance vis-à-vis de la concentration de l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'application de CLO n'a pu être établie que sur les neurones isolés de moustiques Kis. La CLO a été testée dans une gamme de concentrations situées entre 100nM et 300µM. L'amplitude du courant a été mesurée au pic.

La courbe effet-log concentration de CLO est décalée vers la gauche par rapport à la courbe effet-log[ACh], ce qui suggère que les nAChRs de moustiques Kis sont plus sensibles au néonicotinoïde qu'à l'ACh pour de faibles concentrations (**Figure 69A**). Le courant ionique entrant induit par la CLO apparaît donc pour une concentration de 1 $\mu$ M contre 10 $\mu$ M avec l'ACh. De plus, l'amplitude maximale du courant ionique entrant est atteinte pour une concentration de 30 $\mu$ M de CLO ( $-52,7 \pm 6,7$ pA) (**Figure 69A, B**) contre 1mM avec l'ACh. Cependant, le premier plateau qui a été observé entre 30 $\mu$ M et 100 $\mu$ M sur la courbe effet-log concentration de l'ACh apparaît aussi mais plus marqué sur la courbe effet-log concentration de CLO entre 3 et 10 $\mu$ M. A plus forte concentration (>30 $\mu$ M), l'effet de l'insecticide semble diminuer et l'amplitude du courant ionique entrant retrouve celle du premier plateau de la courbe effet log concentration de la CLO (environ 17pA).

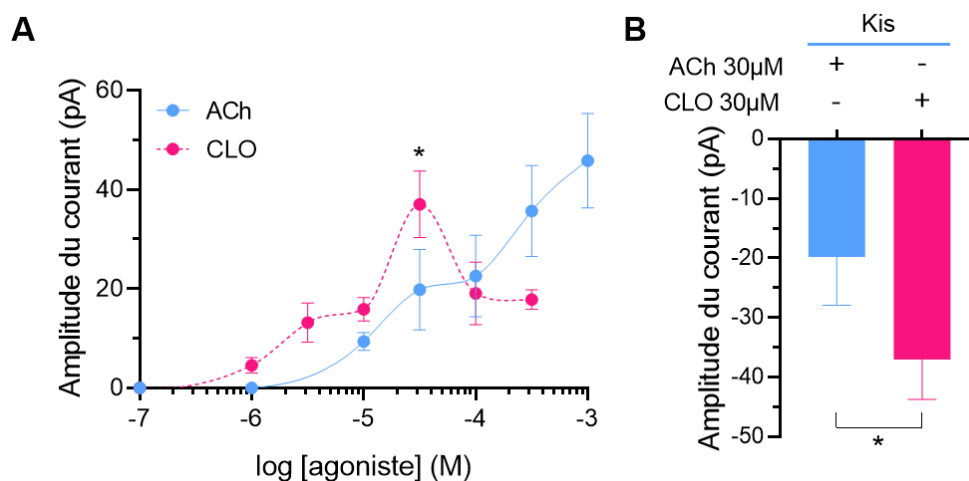


Figure 69 : Dépendance vis-à-vis de la concentration de l'effet de la CLO sur les neurones isolés de moustiques Kis. A) Superposition des courbes effet-log concentration de l'ACh et de la CLO réalisées à partir de l'amplitude des courants sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=5-15). B) Histogrammes comparatifs illustrant l'amplitude du courant ionique entrant mesurée au pic induit par l'ACh et la CLO à 30 $\mu$ M sur les neurones isolés de moustiques Kis. Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. \* $p < 0,05$ .

Il a été montré que la CLO est responsable d'une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ , et qu'une élévation trop forte de cette dernière induit une diminution de l'effet des néonicotinoïdes sur les neurones DUM de blatte *P. americana* (Calas-List *et al.*, 2013; Goulu, 2015; Moreau *et al.*, 2020). Ce profil de courbe effet log concentration est donc bien connu. Comme la voie modulatrice de l'activité des nAChRs à forte concentration de CLO implique le calcium intracellulaire, l'effet de la CLO sur la  $[Ca^{2+}]_i$  a été étudié dans la partie suivante.



### 1.3. Effet de la clothianidine sur les variations de calcium dans les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

L'objectif de ce travail de thèse est de développer une stratégie de LAV qui se base sur les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  par l'utilisation d'un agent synergisant. Comme évoqué précédemment, la CLO est responsable d'une élévation de calcium dans les neurones de la blatte *P. americana* (Calas-List *et al.*, 2013). Il a donc fallu vérifier si cet effet est retrouvé dans les neurones de moustiques *An. gambiae* et s'il est influencé par les modifications des propriétés fonctionnelles des nAChRs que nous avons montré dans les neurones isolés de moustiques résistants.

Afin d'étudier l'effet de la CLO sur les variations de calcium intracellulaire, la technique d'imagerie calcique a été utilisée. La CLO a été appliquée par le bain à une concentration de 0,1nM pendant 5 minutes sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.

La CLO à 0,1nM induit une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  significativement plus importante dans les neurones isolés de moustiques AcerKis que dans les neurones Kis et KdrKis (**Figure 70A, B**). L'élévation en calcium provoquée par la CLO n'est pas significativement différente entre les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis.

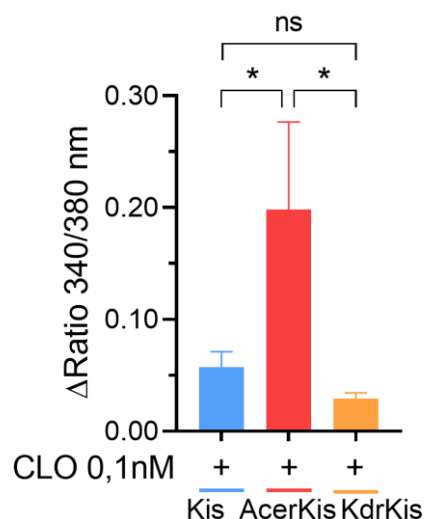


Figure 70 : Histogrammes comparatifs illustrant l'effet sur la variation de calcium de l'application de CLO à 0,1nM pendant 5 minutes sur les neurones isolés de moustiques Kis (n=15), AcerKis (n=6) et KdrKis (n=9) chargés en Fura-2AM. Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non-significatif, \* $p < 0,05$ .

L'effet plus important de la CLO sur les variations de calcium dans les neurones AcerKis est cohérent avec l'expression d'une autre population de nAChRs qui a été montrée précédemment dans ces neurones. Cette donnée est importante à prendre en compte puisque le répulsif IR3535 qui sera utilisé comme agent synergisant pour potentialiser l'effet de la CLO *in vivo* sur les larves de moustiques est responsable d'une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$ .

## 2. Effet du triflumézopyrime sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

### 2.1. Effet du triflumézopyrime sur l'amplitude du courant induit par l'ACh dans les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

Le triflumézopyrime (TRIF) (**Figure 71A**) n'a jamais été utilisé directement contre les moustiques et semble particulièrement intéressants puisqu'il n'y a pas de résistance vis-à-vis de cet insecticide. Etant donné que nous avons mis en évidence des modifications du système cholinergique chez les moustiques AcerKis et KdrKis, l'évaluation de l'effet du TRIF *in vitro* est primordial pour développer une nouvelle stratégie de LAV qui permet de contrôler les populations de moustiques résistants aux insecticides les plus utilisés.

L'étude de l'efficacité de cet insecticide a été menée avec la technique électrophysiologique du patch-clamp en configuration cellule entière en condition de potentiel imposé à -50mV sur les neurones isolés des moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. Pour rappel, cette molécule est un antagoniste compétitif des nAChRs (Cordova *et al.*, 2016; Holyoke *et al.*, 2017). Nous avons donc testé sa capacité à inhiber le courant ionique entrant induit par l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. Puisque le TRIF se fixe sur le site orthostérique du nAChR, la co-application de TRIF devrait diminuer l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh.

Le TRIF a été appliqué en prétraitement de 5 minutes et co-appliqué avec l'ACh (1mM) dans une gamme de concentrations comprises entre 0,1pM et 100nM sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. Le prétraitement avec le TRIF induit une inhibition du courant ionique entrant généré par l'ACh à 1mM à partir d'une concentration de 1pM sur les neurones isolés de moustiques des trois souches (**Figure 71B, C**). Au fur et à mesure que la concentration de TRIF augmente, l'amplitude du courant induit par l'ACh diminue jusqu'à être pratiquement

nulle pour 1nM de TRIF. Le TRIF inhibe 50% du courant ionique entrant ( $CI_{50}$ ) à une concentration d'environ 10pM ( $10^{-11}M$ ) sur les neurones isolés des trois souches de moustiques (**Figure 71D**). Cet insecticide agit donc à de très faibles concentrations sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.

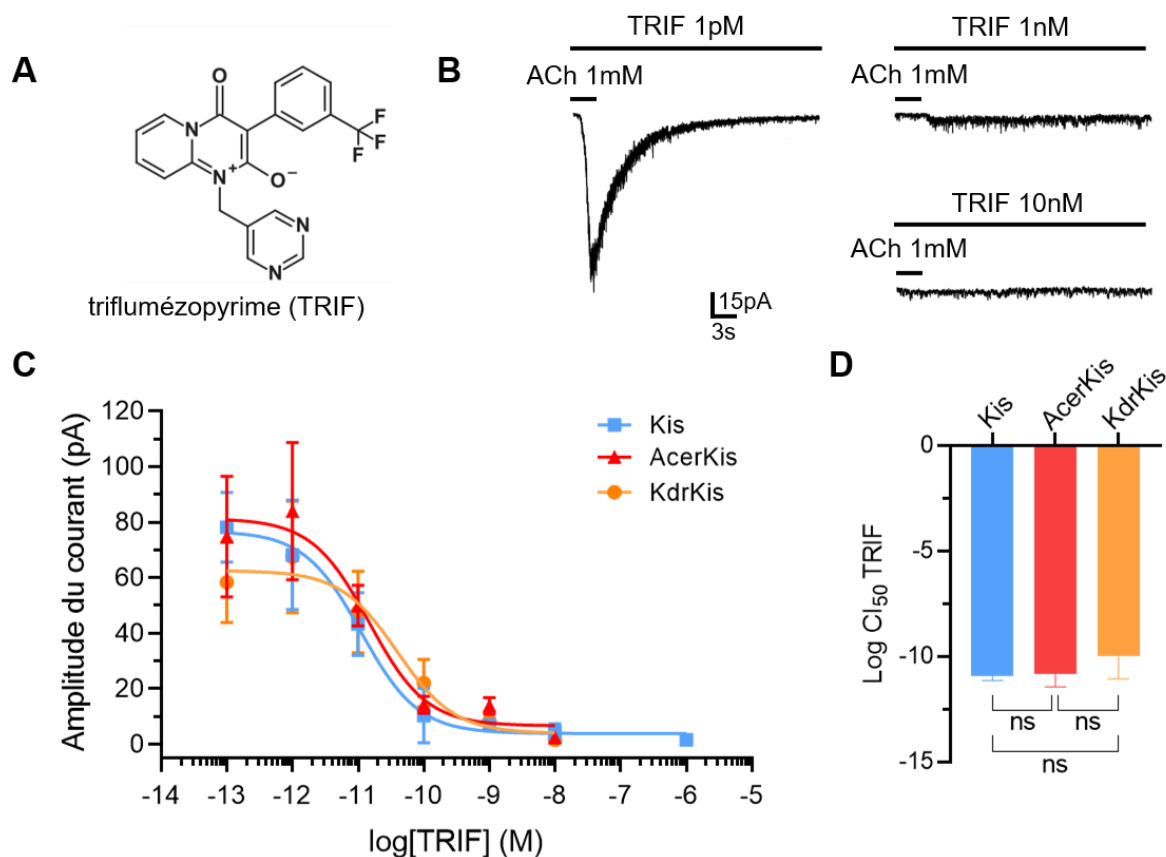


Figure 71 : Effet d'une concentration croissante de TRIF sur le courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. A) Représentation de la structure chimique du triflumézopyrime (TRIF). B) Illustration de l'effet de l'application de TRIF à 1pM, 1nM et 10nM pendant 5 minutes sur le courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM (application de 3s ; potentiel de référence -50mV) sur les neurones isolés de moustiques. C) Effet de l'application d'une concentration croissante de triflumézopyrime (TRIF) sur l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM sur des neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. D) Logarithme de la concentration de TRIF inhibant 50% ( $Log CI_{50}$ ) du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM dans des neurones isolés de moustiques Kis ( $CI_{50} = 11pM$ ), AcerKis ( $CI_{50} = 15pM$ ) et KdrKis ( $CI_{50} = 39pM$ ). A-C, Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M. ; D : Données exprimées par la moyenne  $\pm$  intervalle de confiance à 95%. ns : non significatif.

## 2.2. Effet du triflumézopyrime sur les variations de calcium induites par l'ACh dans les neurones isolés de moustiques KdrKis

Notre stratégie s'appuie sur l'utilisation d'un agent synergisant capable d'augmenter la  $[Ca^{2+}]_i$ , il a donc fallu déterminer si l'application de TRIF influence les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  induites par l'ACh. Une étude préliminaire avec la technique d'imagerie calcique a été menée sur les neurones isolés de moustiques KdrKis. Nous ciblons cette souche en priorité puisque la mutation L1014F qu'elle porte pose un problème majeur en santé publique. De plus, nous supposons que l'ACh n'est pas en excès dans la fente synaptique dans la souche KdrKis, contrairement à la souche AcerKis, car le nombre de canaux  $Ca_v$  activables impliqués dans la sécrétion d'ACh est réduit.

Le TRIF a tout d'abord été appliqué seul en prétraitement par le bain à une concentration de 1nM pendant 5 minutes sur les neurones isolés, puis en combinaison avec l'ACh à 1 $\mu$ M et à 30 $\mu$ M pendant 5 minutes.

Tout d'abord, il est important de noter que l'application du TRIF seul n'induit pas de variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  sur les neurones isolés de moustiques KdrKis (**Figure 72**).

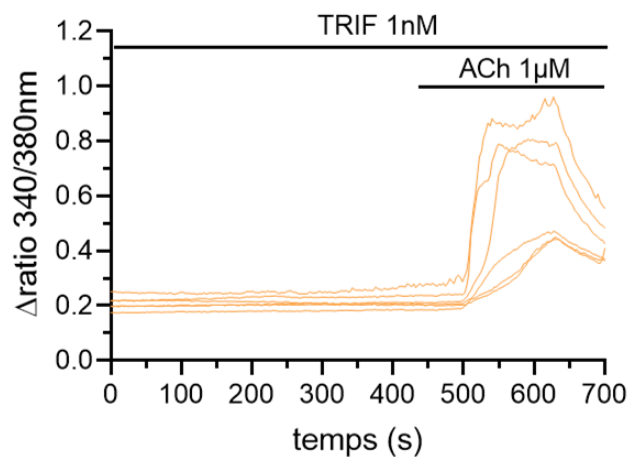


Figure 72 : Effet du TRIF à 1nM sur les variations de calcium intracellulaire sur les neurones isolés de moustiques KdrKis. Spectres représentatifs de l'évolution dans le temps de la variation de calcium intracellulaire exprimée en  $\Delta$ ratio 340/380nm pendant l'application de TRIF à 1nM pendant 5 minutes sur plusieurs neurones isolés de moustiques KdrKis chargés en Fura-2AM. En fin d'expérimentation, un contrôle positif est effectué en perfusant de l'ACh à 1 $\mu$ M.

Par contre, lorsqu'il est co-appliqué avec l'ACh, les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'ACh est diminuée. La valeur moyenne du  $\Delta\text{ratio}_{340/380\text{nm}}$  passe de  $0,76 \pm 0,15$  avec l'ACh à  $1\mu\text{M}$  seule à  $0,28 \pm 0,06$  lorsqu'elle est co-appliquée avec le TRIF à  $1\text{nM}$ , ce qui représente une réduction d'environ 63% de l'effet de l'ACh (**Figure 73A**). Pour une plus forte concentration d'ACh ( $30\mu\text{M}$ ), la valeur moyenne du  $\Delta\text{ratio}_{340/380\text{nm}}$  passe de  $0,99 \pm 0,07$  avec l'ACh seule à  $0,49 \pm 0,13$  lorsqu'elle est co-appliquée avec le TRIF à  $1\text{nM}$ , ce qui représente une réduction d'environ 50% de l'effet de l'ACh (**Figure 73B**). En augmentant encore la concentration en ACh ( $100\mu\text{M}$ ), la valeur moyenne du  $\Delta\text{ratio}_{340/380\text{nm}}$  passe de  $0,58 \pm 0,09$  avec l'ACh seule à  $0,43 \pm 0,1$  lorsqu'elle est co-appliquée avec le TRIF à  $1\text{nM}$  (**Figure 73C**). La différence d'effet de l'ACh seule et co-appliquée avec le TRIF à  $1\text{nM}$  n'est pas statistiquement significative. Dans cette dernière expérience, il serait cependant nécessaire d'augmenter le nombre de réplicats car les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  ont été étudiées sur seulement 3 cellules pour l'ACh seule et 2 cellules en co-application avec le TRIF à  $1\text{nM}$ .

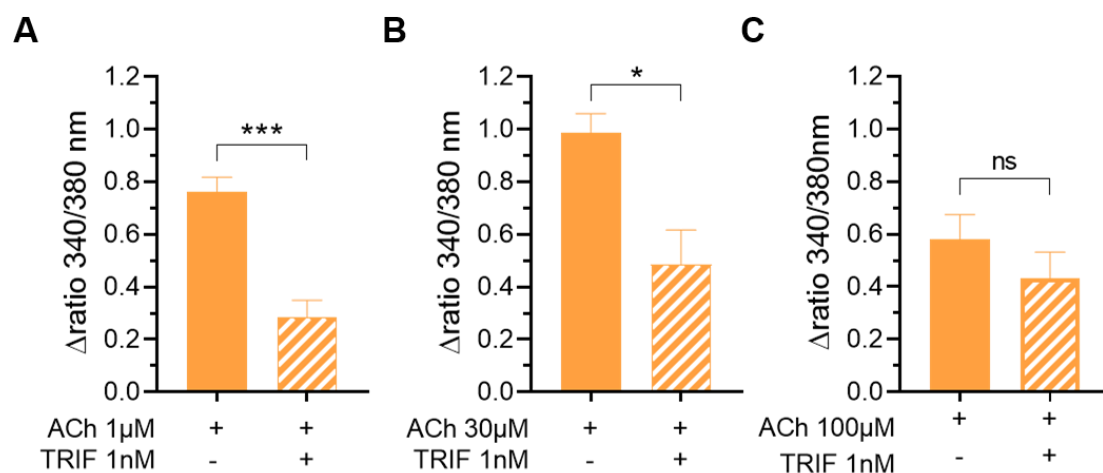


Figure 73 : Effet du TRIF à  $1\text{nM}$  sur les variations de calcium intracellulaire induite par l'ACh à différentes concentrations sur les neurones isolés de moustiques KdrKis. A) Histogrammes comparatifs illustrant l'effet sur la variation de calcium de l'application d'ACh à  $1\mu\text{M}$ , B)  $30\mu\text{M}$  et C)  $100\mu\text{M}$  seule ( $n=2-7$ ) ou co-appliquée avec le TRIF à  $1\text{nM}$  ( $n=3-11$ ) pendant 5 minutes sur les neurones isolés de moustiques KdrKis chargés en Fura-2AM. Données exprimées par la moyenne  $\pm$  S.E.M.. ns : non significatif ;  $*p<0,05$  ;  $***p<0,001$ .

L'inhibition par le TRIF à  $1\text{nM}$  des variations de calcium induite par l'ACh est moins forte à mesure que la concentration d'ACh appliquée sur les neurones isolés de moustiques KdrKis augmente. Ces résultats confirment que le TRIF, en tant qu'antagoniste compétitif, n'induit pas de variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  et que son activité insecticide provient d'une inhibition de l'effet de l'ACh sur les nAChRs.

### Chapitre 3 : Evaluation *in vivo* de l'effet synergique de l'IR3535 associé à des insecticides ciblant les récepteurs nicotiques sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

En s'appuyant sur l'étude comparative menée *in vitro* sur la modulation de l'effet de l'ACh et des insecticides qui ciblent les nAChRs montrant des différences d'effet entre la souche sensible et les souches résistantes, l'efficacité de la CLO et du TRIF a été testée *in vivo* sur des larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. Un autre objectif de cette étude est de vérifier *in vivo* s'il existe un impact des mutations G119S et L1014F sur l'efficacité de ces insecticides en accord avec ce que nous avons montré *in vitro*. Le choix de tester les insecticides sur les larves provient du fait que ces molécules n'ont jamais été testées en tant que larvicide contre les moustiques *An. gambiae*. De plus, les tests larvaires standardisés par l'OMS permettent d'obtenir une forte reproductibilité des résultats et de tester rapidement si les insecticides sont efficaces sur les moustiques.

Dans un premier temps, l'efficacité de la CLO et du TRIF a été évaluée individuellement sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis grâce aux tests larvaires standardisés par l'OMS (OMS, 2005). Avec la même technique, ces insecticides sont ensuite associés à l'IR3535. Il a été montré précédemment que ce répulsif était capable de potentialiser l'effet des insecticides *in vitro* sur les neurones de blattes *P. americana* et de moustique *An. gambiae* via une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  (El-Adouzi *et al.*, 2020; Moreau *et al.*, 2020). Il est donc utilisé en tant qu'agent synergisant pour potentialiser l'efficacité de la CLO et du TRIF et réduire les doses efficaces.

## 1. Effet des insecticides néonicotinoïdes et mésoioniques sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

### 1.1. Evaluation de l'efficacité de la clothianidine seule sur des larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

Les  $CL_{30}$ ,  $CL_{50}$  et  $CL_{95}$  sont déterminées à 24 et 48h avec un intervalle de confiance à 95% sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. Les résultats issus des bioessais sont présentés dans le **tableau 15**.

Après 24h d'exposition à la CLO, les  $CL_{30}$ ,  $CL_{50}$  et  $CL_{95}$  ne sont pas significativement différentes entre les larves des trois souches de moustiques. Après 48h d'exposition, les  $CL_{30}$ ,  $CL_{50}$  et  $CL_{95}$  sont décalées vers des valeurs plus faibles en raison du contact plus long avec l'insecticide. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence à la  $CL_{95}$  entre les trois souches. Par contre, il est important de noter qu'après 48h d'exposition, la  $CL_{50}$  est significativement plus faible pour les larves AcerKis et plus élevée pour les larves KdrKis comparée aux larves Kis. La  $CL_{30}$  à 48h est significativement plus faible pour les larves AcerKis comparée à celle déterminée pour les larves Kis et KdrKis. Les  $CL_{30}$ ,  $CL_{50}$  et  $CL_{95}$  déterminées à 48h sont illustrées **en figure 74**.

Souche de moustiques	n*	Temps d'exposition	CL <sub>30</sub> (IC 95%)	CL <sub>50</sub> (IC 95%)	CL <sub>95</sub> (IC 95%)
Kis	4	24h	0,027 (0,020 - 0,034)	0,030 (0,026 - 0,036)	0,062 (0,050 - 0,101)
	4	48h	0,015 (0,011 - 0,017)	0,019 (0,015 - 0,022)	0,039 (0,032 - 0,057)
AcerKis	4	24h	0,017 (0,011 - 0,021)	0,018 (0,014 - 0,026)	0,042 (0,031 - 0,076)
	3	48h	<b>0,008</b> <b>(0,007 - 0,010)</b>	<b>0,012</b> <b>(0,010 - 0,013)</b>	0,024 (0,021 - 0,034)
KdrKis	4	24h	0,029 (0,020 - 0,035)	0,032 (0,024 - 0,041)	0,081 (0,059 - 0,130)
	3	48h	0,018 (0,015 - 0,022)	<b>0,029</b> <b>(0,025 - 0,033)</b>	0,059 (0,049 - 0,078)

Tableau 15 : Efficacité de la clothianidine sur les larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis. \*un test inclut 700 larves tests exposées à l'insecticide dilué dans l'éthanol et 100 larves contrôles exposées uniquement à l'éthanol. Les concentrations létales (CL) et les intervalles de confiance (IC) sont exprimés en mg/L. Lorsque les IC à 95% ne se superposent pas, la différence est jugée significative. Les valeurs significativement différentes de la souche Kis dans les mêmes conditions expérimentales sont indiquées en gras dans le tableau.

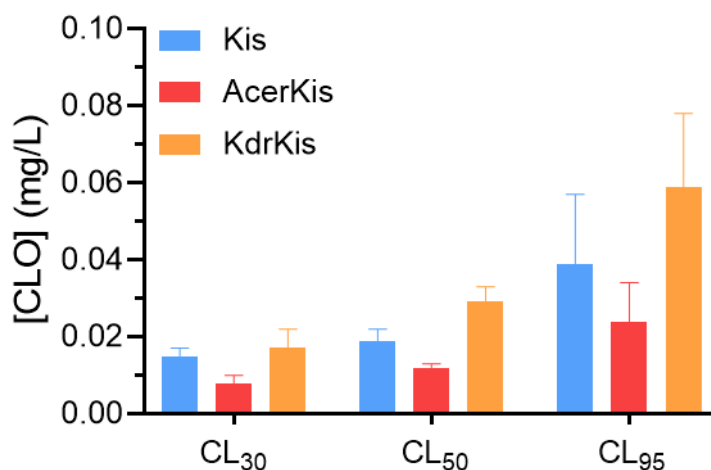


Figure 74 : Concentration létale de clothianidine (CLO) induisant 30%, 50% et 95% de mortalité (respectivement CL<sub>30</sub> ; CL<sub>50</sub> ; CL<sub>95</sub>) chez des larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis après 48h d'exposition. Les données sont exprimées par la moyenne ± intervalle de Confiance à 95% (IC).



La CLO est donc efficace sur les larves Kis, AcerKis et KdrKis. Cependant, il existe des différences d'efficacité de la CLO entre les larves des trois souches de moustiques qui corroborent les résultats obtenus *in vitro* avec la technique d'imagerie calcique (**Figure 70**).

## 1.2. Evaluation de l'efficacité du triflumézopyrime seul sur des larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

Les  $CL_{30}$ ,  $CL_{50}$  et  $CL_{95}$  sont déterminées à 24 et 48h avec un intervalle de confiance à 95% sur les larves Kis, AcerKis et KdrKis. Les résultats issus des bioessais sont présentés dans le **tableau 16**.

Après 24h et 48h d'exposition au TRIF, les  $CL_{30}$ ,  $CL_{50}$  et  $CL_{95}$  ne sont pas significativement différentes entre les larves des trois souches de moustiques. Après 48h d'exposition, les  $CL_{30}$ ,  $CL_{50}$  et  $CL_{95}$  sont décalées vers des valeurs plus faibles en raison du contact plus long avec l'insecticide. A cause de l'hétérogénéité de la réponse entre les réplicats et donc de l'intervalle de confiance trop large, il est difficile de différencier la  $CL_{30}$  de la  $CL_{50}$ . De même, la  $CL_{95}$  est assez peu fiable dans une gamme de concentration aussi forte. Les  $CL_{30}$ ,  $CL_{50}$  et  $CL_{95}$  déterminées à 48h sont illustrées en **figure 75**. Pour la suite des expériences, seule la  $CL_{50}$ , plus robuste statistiquement dans le cadre d'un modèle log-probit sera donc considérée.

Souche de moustiques	n*	Temps d'exposition	CL <sub>30</sub> (IC 95%)	CL <sub>50</sub> (IC 95%)	CL <sub>95</sub> (IC 95%)
Kis	3	24h	0,517 (0,360 - 0,640)	0,788 (0,620 - 1,033)	2,625 (1,879 - 4,553)
	3	48h	0,345 (0,243 - 0,427)	0,473 (0,367 - 0,574)	1,488 (1,089 - 2,068)
AcerKis	4	24h	0,484 (0,318 - 0,631)	0,729 (0,544 - 0,909)	2,703 (1,781 - 4,061)
	4	48h	0,311 (0,228 - 0,383)	0,455 (0,365 - 0,546)	1,516 (1,196 - 2,359)
KdrKis	4	24h	0,622 (0,484 - 0,751)	0,874 (0,722 - 1,125)	2,727 (1,817 - 4,602)
	4	48h	0,430 (0,317 - 0,528)	0,565 (0,457 - 0,722)	1,326 (1,028 - 1,665)

Tableau 16 : Efficacité du triflumézopyrime sur les larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis. \*un test inclut 350 larves tests exposées à l'insecticide dilué dans l'éthanol et 50 larves contrôles exposées uniquement à l'éthanol. Les concentrations létales (CL) et les intervalles de confiance à 95% (IC 95%) sont exprimés en mg/L. Lorsque les IC à 95% ne se superposent pas, la différence est jugée significative.

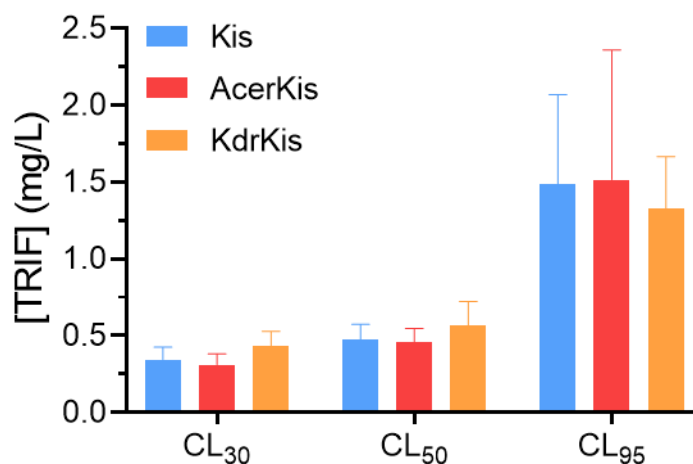


Figure 75 : Concentration létale de triflumézopyrime (TRIF) induisant 30%, 50% et 95% de mortalité (respectivement CL<sub>30</sub> ; CL<sub>50</sub> ; CL<sub>95</sub>) chez des larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis après 48h d'exposition. Les données sont exprimées par la moyenne ± intervalle de confiance à 95% (IC 95%).

Le TRIF est donc efficace sur les larves Kis, AcerKis et KdrKis. Etonnamment, les concentrations nécessaires pour obtenir une mortalité sont bien plus élevées que pour la CLO alors que les résultats obtenus *in vitro* montrent que le TRIF est efficace à plus faible

concentration par rapport à la CLO. La  $CL_{50}$  est de 0,455 à 0,565mg/L pour le TRIF après 48h d'exposition contre 0,012 à 0,029mg/L pour la CLO. Cependant, la particularité intéressante du TRIF que ne présente pas la CLO est sa capacité à agir de la même manière sur les trois souches de moustiques, indépendamment de leur résistance à d'autres classes d'insecticides.

## 2. Effet des combinaisons d'insecticides néonicotinoïdes et mésoioniques avec l'IR3535 sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

### 2.1. Evaluation de l'efficacité de l'IR3535 seul sur la mortalité des larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

L'IR3535, dans notre stratégie, doit être utilisé comme un agent synergisant (i.e., potentialiser l'effet insecticide). Par conséquent, il ne doit pas produire de mortalité importante lorsqu'il est testé seul. Il a donc été nécessaire de tester l'effet de l'IR3535 seul sur la mortalité des larves de moustiques *An. gambiae* souches Kis, AcerKis et KdrKis pour déterminer la gamme de concentrations à tester en association par la suite.

Des tests larvaires ont été réalisés pour évaluer la mortalité induite par l'IR3535 seul. La première gamme testée allant de 1 à 6g/L pour potentialiser l'effet des insecticides s'appuie sur des tests précédents réalisés au laboratoire MIVEGEC (communication personnelle par Marine El-Adouzi). L'IR3535 commence à induire une mortalité à une concentration de 1g/L à 24h (**Figure 76A**). La mortalité induite par le répulsif n'augmente pas jusqu'à 5g/L et légèrement à 6g/L après 24h d'exposition. Après 48h d'exposition, l'augmentation de la mortalité est observée à partir de 3g/L sur les larves AcerKis et KdrKis et à partir de 4g/L sur les larves Kis (**Figure 76B**).

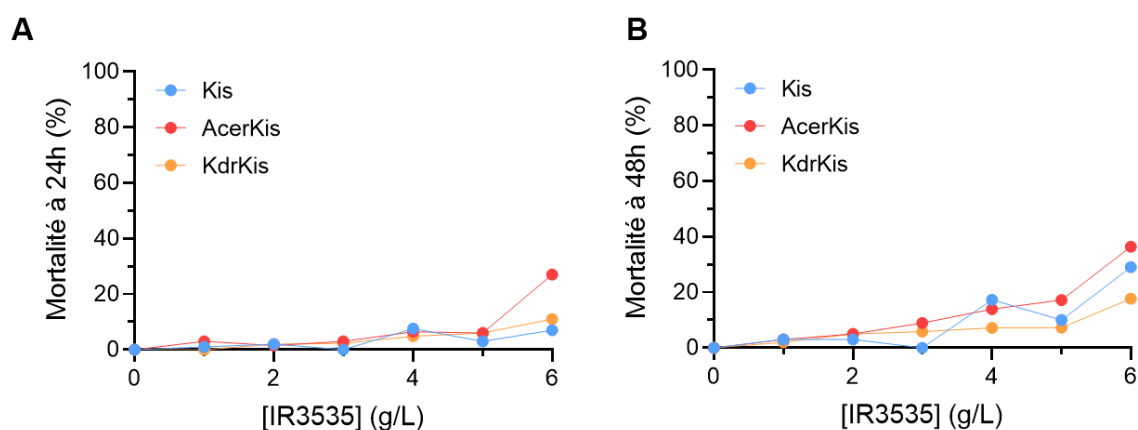


Figure 76 : Effet sur la mortalité de l'exposition des larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis après A) 24h et B) 48h de contact avec une concentration croissante d'IR3535 (1 à 6 g/L). n=1-9 ; un test inclut 100 larves tests par concentration d'IR3535 exposées au répulsif et 100 larves contrôles exposées uniquement à l'éthanol. Données exprimées par la moyenne  $\pm$  intervalle de confiance à 95% (IC 95%).

Dans le cadre d'une association insecticide/IR3535, la stratégie que nous développons consiste à tester une gamme de concentrations d'IR3535 induisant une mortalité relativement faible ( $\leq 20\%$ ) car celui-ci doit être considéré comme un agent synergisant dépourvu d'activité insecticide propre tout au long du test. La gamme de concentrations retenue qui est associée à la CLO et au TRIF est donc située entre 1g/L et 4g/L d'IR3535. A une concentration de 4g/L, la plus forte de la gamme retenue, l'IR3535 induit moins de 20% de mortalité sur les larves des trois souches de moustiques, que ce soit après un temps d'exposition de 24 ou de 48h (**Tableau 17**).

Souche de moustique	n*	Temps d'exposition	Mortalité induite par l'IR3535 à 4g/L (%) (IC 95%)
Kis	5	24h	7,6 (7,3 - 7,8)
	4	48h	17,2 (16,5 - 17,9)
AcerKis	9	24h	6,4 (5,9 - 6,9)
	9	48h	13,9 (13,0 - 14,8)
KdrKis	9	24h	4,9 (4,5 - 5,3)
	9	48h	7,2 (6,8 - 7,7)

Tableau 17 : Mortalité induite par l'IR3535 à 4g/L sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis après 24 et 48h d'exposition. Un test inclut 100 larves tests exposées au répulsif à 4g/L et 100 larves contrôles exposées uniquement à l'éthanol. Données exprimées par la moyenne  $\pm$  intervalle de confiance à 95% (IC 95%).

## 2.2. Effet synergique d'une combinaison de la clothianidine avec l'IR3535 sur des larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis

### 2.2.1. Association de la clothianidine à la CL<sub>50</sub> avec IR3535

L'IR3535 a d'abord été associé à la CL<sub>50</sub> à 48h de CLO sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis dans une gamme de 1 à 4g/L avant de faire des lectures de mortalité à 24 et à 48h. Les **tableaux 18, 19 et 20** reprennent les comparaisons entre les mortalités attendues calculées et les mortalités observées induites par la combinaison de la CL<sub>50</sub> de CLO avec des doses croissantes d'IR3535 sur les larves de moustiques souche Kis, AcerKis et KdrKis, respectivement.

Kis				
	Temps d'exposition	Mortalité attendue (%) (IC 95%)	Mortalité observée (%) (IC 95%)	Significativité
<b>CLO seule (0,019mg/L)</b>	24h		4,7 (4,5 - 4,9)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	24h	5,6 (5,3 - 5,9)	13 (12,6 - 13,4)	**
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	24h	6,6 (6,3 - 6,8)	21,3 (20,7 - 21,9)	****
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	24h	4,7 (4,4 - 4,9)	33,3 (32,5 - 34,2)	****
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	24h	11,9 (11,6 - 12,2)	33 (30,5 - 35,5)	****
<b>CLO seule (0,019mg/L)</b>	48h		56,0 (55,2 - 56,7)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	48h	57,3 (56,3 - 58,3)	77 (76,2 - 77,8)	****
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	48h	57,3 (56,3 - 58,3)	76 (75,4 - 76,6)	****
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	48h	56 (54,9 - 57,0)	81 (79,3 - 82,7)	****
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	48h	63,6 (62,7 - 64,4)	85,3 (83,6 - 87,0)	****

Tableau 18 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>50</sub> à 48h (0,019mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche Kis. n=3 ; un test inclut 100 larves tests par concentration d'IR3535, 100 larves contrôle exposées uniquement à la CLO et 100 larves contrôle exposées uniquement à l'éthanol. Les données sont exprimées par la moyenne ± intervalle de confiance à 95% (IC 95%). \*\*p<0,01 ; \*\*\*\*p<0,0001.

Sur les larves de moustiques souche Kis, l'association de la CLO à la CL<sub>50</sub> avec l'IR3535 a un effet synergique à toutes les concentrations testées après 24h d'exposition et 48h d'exposition. Après 24h d'exposition, la mortalité observée est en moyenne 3,5 fois plus élevée que la mortalité attendue et 1,4 fois plus élevée après 48h d'exposition.

<b>AcerKis</b>				
	<b>Temps d'exposition</b>	<b>Mortalité attendue (%) (IC 95%)</b>	<b>Mortalité observée (%) (IC 95%)</b>	<b>Significativité</b>
<b>CLO seule (0,012mg/L)</b>	24h		5,2 (5,1 - 5,3)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	24h	8,1 (8,0 - 8,2)	8,6 (8,1 - 9,1)	ns
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	24h	6,4 (6,3 - 6,5)	21,8 (18,9 - 23,1)	****
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	24h	7,7 (7,6 - 7,9)	30,5 (32,0 - 38,0)	****
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	24h	11,0 (10,9 - 11,1)	39,2 (35,8 - 42,6)	****
<b>CLO seule (0,012mg/L)</b>	48h		37,5 (36,9 - 38,1)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	48h	39,4 (38,6 - 40,1)	51,0 (49,7 - 52,3)	***
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	48h	45,6 (45,3 - 45,9)	63,0 (61,4 - 64,6)	****
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	48h	46,5 (46,3 - 46,8)	81,3 (80,1 - 82,6)	****
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	48h	47,4 (46,8 - 48,1)	85,2 (83,9 - 86,6)	****

Tableau 19 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>50</sub> à 48h (0,012mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche AcerKis. n=4 ; un test inclut 100 larves tests par concentration d'IR3535, 100 larves contrôle exposées uniquement à la CLO et 100 larves contrôle exposées uniquement à l'éthanol. Les données sont exprimées par la moyenne ± intervalle de confiance à 95% (IC 95%). ns : non significatif ; \* $p < 0,05$  ; \*\*\* $p < 0,001$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Sur les larves de moustiques souche AcerKis, l'association de la CLO à la CL<sub>50</sub> avec l'IR3535 n'a pas d'effet synergique après 24h d'exposition pour une concentration de 1g/L l'effet est simplement additif. Cependant, un effet synergique est observé pour une concentration supérieure ou égale à 2 g/L d'IR3535. Après 24h d'exposition, pour une concentration d'IR3535 supérieure ou égale à 2g/L, la mortalité observée est en moyenne 3,6 fois plus élevée que la mortalité attendue. Après 48h d'exposition, une synergie est observée pour toutes les

concentrations d'IR3535 testées, la mortalité observée est alors en moyenne 1,6 fois plus élevée que la mortalité attendue.

<b>KdrKis</b>				
	<b>Temps d'exposition</b>	<b>Mortalité attendue (%) (IC 95%)</b>	<b>Mortalité observée (%) (IC 95%)</b>	<b>Significativité</b>
<b>CLO seule (0,029mg/L)</b>	24h		8,3 (7,8 - 8,8)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	24h	8,3 (7,8 - 8,9)	22,3 (21,3 - 23,4)	****
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	24h	10,2 (9,6 - 10,7)	43,1 (41,9 - 44,2)	****
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	24h	10,4 (9,8 - 10,9)	60,7 (58,8 - 62,5)	****
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	24h	12,7 (12,2 - 13,3)	68,3 (67,1 - 69,6)	****
<b>CLO seule (0,029mg/L)</b>	48h		52,3 (50,9 - 53,7)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	48h	53,3 (51,7 - 54,9)	78,0 (77,0 - 79,0)	****
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	48h	54,7 (53,2 - 56,2)	84,3 (83,7 - 85,0)	****
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	48h	55,1 (53,6 - 56,7)	92,0 (91,6 - 92,4)	****
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	48h	55,8 (54,3 - 57,3)	96,3 (96,2 - 96,5)	****

Tableau 20 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>50</sub> à 48h (0,029mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche KdrKis. n=3 ; un test inclut 100 larves tests par concentration d'IR3535, 100 larves contrôle exposées uniquement à la CLO et 100 larves contrôle exposées uniquement à l'éthanol. Les données sont exprimées par la moyenne ± intervalle de confiance à 95% (IC 95%). \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Sur les larves de moustiques souche KdrKis, l'association de la CLO à la CL<sub>50</sub> avec l'IR3535 a un effet synergique pour toutes les concentrations testées après 24h ou 48h d'exposition. La synergie est de plus en plus forte sur les larves KdrKis après 24 ou 48h d'exposition à mesure que la concentration en IR3535 augmente puisque l'écart entre la mortalité moyenne attendue et la mortalité moyenne observée est plus marqué. Après 24h d'exposition, la mortalité observée est en moyenne 4,6 fois plus élevée que la mortalité attendue et 1,6 fois plus élevée après 48h d'exposition.

La combinaison de la CL<sub>50</sub> à 48h de CLO avec l'IR3535 a un effet synergique sur les larves des trois souches de moustiques. Cependant, la concentration d'IR3535 qui induit cet effet synergique varie selon la souche et selon le temps d'exposition.

### 2.2.2. Association de la clothianidine à la CL<sub>30</sub> avec IR3535

Dans l'optique de réduire les concentrations d'insecticides utilisées, la CLO à la CL<sub>30</sub> a été associée à l'IR3535, toujours dans une gamme de concentration allant de 1 à 4g/L. Les **tableaux 21, 22 et 23** reprennent les comparaisons entre les mortalités attendues calculées et les mortalités observées induites par la combinaison de la CL<sub>30</sub> de CLO avec des doses croissantes d'IR3535 sur les larves de moustiques souche Kis, AcerKis et KdrKis, respectivement.

Kis				
	Temps d'exposition	Mortalité attendue (%) (IC 95%)	Mortalité observée (%) (IC 95%)	Significativité
<b>CLO seule (0,015mg/L)</b>	24h		1,7 (1,4 - 1,9)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	24h	2,6 (2,3 - 3,0)	3,7 (3,2 - 4,1)	ns
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	24h	3,7 (3,3 - 4,0)	7,3 (7,0 - 7,7)	*
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	24h	2,3 (2,1 - 2,6)	9,3 (9,0 - 9,7)	***
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	24h	9,1 (8,8 - 9,4)	9,7 (9,1 - 10,2)	ns
<b>CLO seule (0,015mg/L)</b>	48h		37,3 (36,6 - 37,9)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	48h	39,2 (38,3 - 40,0)	44,2 (42,8 - 45,6)	ns
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	48h	39,2 (38,3 - 40,0)	51,5 (49,7 - 53,3)	**
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	48h	37,3 (36,4 - 38,1)	49,6 (49,2 - 50,0)	**
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	48h	48,1 (47,4 - 48,8)	57,8 (56,7 - 58,8)	*

Tableau 21 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>30</sub> à 48h (0,015mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche Kis. n=3 ; un test inclut 100 larves tests par concentration d'IR3535, 100 larves contrôle exposées uniquement à la CLO et 100 larves contrôle exposées uniquement à l'éthanol. Les données sont exprimées par la moyenne ± intervalle de confiance à 95% (IC 95%). ns : non significatif ; \**p*<0,05 ; \*\**p*<0,01 ; \*\*\**p*<0,001.



Sur les larves de moustiques souche Kis, l'association de la CLO à la CL<sub>30</sub> avec l'IR3535 a un effet synergique uniquement à 2 et 3g/L après 24h d'exposition. Pour ces concentrations d'IR3535, la mortalité observée est en moyenne 2,8 fois plus élevée que la mortalité attendue. Après 48h d'exposition, un effet synergique est observé pour toutes les concentrations d'IR3535 testées supérieures à 2g/L. La mortalité observée est en moyenne 1,2 fois plus élevée que la mortalité attendue.

<b>AcerKis</b>				
	<b>Temps d'exposition</b>	<b>Mortalité attendue (%) (IC 95%)</b>	<b>Mortalité observée (%) (IC 95%)</b>	<b>Significativité</b>
<b>CLO seule (0,008mg/L)</b>	24h		5,0 (4,7 - 5,3)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	24h	7,8 (7,5 - 8,2)	6,5 (6,0 - 7,0)	ns
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	24h	6,4 (6,1 - 6,7)	9,0 (8,2 - 9,8)	**
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	24h	7,7 (7,4 - 8,1)	14,0 (13,2 - 14,8)	**
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	24h	10,9 (10,7 - 11,3)	31,5 (29,9 - 33,1)	****
<b>CLO seule (0,008mg/L)</b>	48h		23,3 (22,5 - 24,1)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	48h	25,6 (24,7 - 26,5)	45,4 (44,2 - 46,6)	****
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	48h	28,9 (28,0 - 29,8)	42,5 (41,3 - 43,6)	****
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	48h	30,1 (29,3 - 31,0)	65,7 (62,6 - 68,9)	****
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	48h	33,9 (33,2 - 34,8)	85,4 (83,2 - 87,5)	****

Tableau 22 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>30</sub> à 48h (0,008mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche AcerKis. n=4 ; un test inclut 100 larves tests par concentration d'IR3535, 100 larves contrôle exposées uniquement à la CLO et 100 larves contrôle exposées uniquement à l'éthanol. Les données sont exprimées par la moyenne ± intervalle de confiance à 95% (IC 95%). ns : non significatif ; \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Sur les larves de moustiques souche AcerKis, l'association de la CLO à la CL<sub>30</sub> avec l'IR3535 a un effet synergique à partir de 1g/L après 24h d'exposition. Pour ces concentrations d'IR3535, la mortalité observée est en moyenne 2,2 fois plus élevée que la mortalité attendue. Après 48h d'exposition, un effet synergique est observé pour toutes les concentrations d'IR3535 testées. La mortalité observée est en moyenne 2 fois plus élevée que la mortalité attendue.

<b>KdrKis</b>				
	<b>Temps d'exposition</b>	<b>Mortalité attendue (%) (IC 95%)</b>	<b>Mortalité observée (%) (IC 95%)</b>	<b>Significativité</b>
<b>CLO seule (0,018mg/L)</b>	24h		3,0 (2,9 - 3,1)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	24h	3,2 (3,0 - 3,3)	9,2 (8,7 - 9,7)	****
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	24h	4,9 (4,8 - 5,1)	11,3 (10,7 - 11,9)	****
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	24h	5,2 (5,1 - 5,4)	25,2 (23,4 - 26,7)	****
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	24h	7,6 (7,5 - 7,8)	32,0 (30,6 - 33,4)	****
<b>CLO seule (0,018mg/L)</b>	48h		35,5 (34,8 - 36,2)	
<b>CLO +1g/L IR3535</b>	48h	36,8 (35,9 - 37,8)	38,1 (36,2 - 40,0)	ns
<b>CLO +2g/L IR3535</b>	48h	38,7 (37,8 - 39,7)	44,5 (42,9 - 46,1)	*
<b>CLO +3g/L IR3535</b>	48h	39,3 (38,4 - 40,2)	51,3 (50,0 - 52,6)	****
<b>CLO +4g/L IR3535</b>	48h	40,2 (39,3 - 41,1)	59,6 (57,6 - 61,6)	****

Tableau 23 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>30</sub> à 48h (0,018mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche KdrKis. n=6 ; un test inclut 100 larves tests par concentration d'IR3535, 100 larves contrôle exposées uniquement à la CLO et 100 larves contrôle exposées uniquement à l'éthanol. Les données sont exprimées par la moyenne ± intervalle de confiance à 95% (IC 95%). ns : non significatif ; \* $p < 0,05$  ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Sur les larves de moustiques souche KdrKis, l'association de la CLO à la CL<sub>30</sub> avec l'IR3535 a un effet synergique pour toutes les concentrations d'IR3535 testées. La mortalité observée est en moyenne 3,9 fois plus élevée que la mortalité attendue. Après 48h d'exposition, un effet synergique est observé pour toutes les concentrations d'IR3535 testées supérieures ou égales à 2g/L. Pour ces concentrations d'IR3535, la mortalité observée est en moyenne 1,3 fois plus élevée que la mortalité attendue.

La combinaison de la CL<sub>50</sub> à 48h de CLO avec l'IR3535 a un effet synergique sur les larves des trois souches de moustiques. En accord avec les observations précédentes, la concentration d'IR3535 qui induit cet effet synergique varie selon la souche et selon le temps d'exposition.

### 2.3. Effet synergique d'une combinaison de triflumézopryme avec l'IR3535 sur des larves de moustiques Kis

Nous avons montré que le TRIF agit à des doses bien plus fortes que la CLO sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. Compte tenu du fait que la CL<sub>30</sub> du TRIF est difficile à distinguer de la CL<sub>50</sub>, la CL<sub>50</sub> du TRIF a été retenue pour être utilisée en association avec l'IR3535 dans une gamme de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques. En effet, la CL<sub>50</sub> est une valeur statistiquement plus fiable après analyse log-probit, l'intervalle de confiance est donc réduit autour de ce point. Il n'a été possible de réaliser que 2 réplicats de l'association du TRIF avec l'IR3535 sur les larves de la souche Kis. Ces résultats préliminaires sont présentés dans le **tableau 24**.

Kis				
	Temps d'exposition	Mortalité attendue (%) (IC 95%)	Mortalité observée (%) (IC 95%)	Significativité
TRIF seul (0,5mg/L)	24h		14,0 (12,8 - 15,2)	
TRIF +1g/L IR3535	24h	14,9 (13,2 - 16,5)	33,0 (32,2 - 33,4)	**
TRIF +2g/L IR3535	24h	15,7 (14,1 - 17,3)	37,6 (34,8 - 40,5)	***
TRIF +3g/L IR3535	24h	14,0 (12,3 - 15,7)	41,2 (39,4 - 43,1)	****
TRIF +4g/L IR3535	24h	20,5 (19,0 - 22,1)	40,3 (36,5 - 44,1)	**
TRIF seul (0,5mg/L)	48h		36,0 (35,6 - 36,4)	
TRIF +1g/L IR3535	48h	37,9 (37,4 - 38,4)	63,0 (58,9 - 67,1)	***
TRIF +2g/L IR3535	48h	37,9 (37,4 - 38,5)	70,2 (68,5 - 71, 9)	****
TRIF +3g/L IR3535	48h	36,0 (35,4 - 36,5)	73,9 (71,7 - 76,1)	****
TRIF +4g/L IR3535	48h	47,0 (46,6 - 47,5)	78,1 (75,3 - 81,0)	****

Tableau 24 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison du TRIF à la CL<sub>50</sub> à 48h (0,5mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche Kis. n=2 ; un test inclut 50 larves tests par concentration d'IR3535, 50 larves contrôle exposées uniquement au TRIF et 50 larves contrôle exposées uniquement à l'éthanol. Les données sont exprimées par la moyenne ± intervalle de confiance à 95% (IC 95%). \*\*p<0,01 ; \*\*\*p<0,001 ; \*\*\*\*p<0,0001.

Dans ces résultats préliminaires, un effet synergique de l'association du TRIF avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L est observé. Après 24h d'exposition, la mortalité observée est en moyenne 2,3 fois plus élevée que la mortalité attendue et 1,8 fois plus élevée après 48h d'exposition. Cette association semble prometteuse et il faudrait la tester sur les larves des souches résistantes de moustiques AcerKis et KdrKis.

## Discussion et perspectives

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse montrent qu'il existe des conséquences cellulaires et moléculaires au niveau neuronal associées aux mécanismes de résistance par mutation de la cible chez les moustiques. En effet, les propriétés électropharmacologiques des nAChRs exprimés chez les moustiques résistants souches AcerKis et KdrKis portant respectivement les mutations G119S sur l'AChE et L1014F sur le canal Nav sont altérées. Ces mécanismes de compensation n'avaient jamais été caractérisés auparavant.

### 1. Les mécanismes de compensation : une nouvelle manière de considérer les mécanismes de résistance

L'étude électropharmacologique comparative que nous avons menée, dans un premier temps, sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis nous a permis de mettre en évidence l'expression d'une population supplémentaire et différente de nAChRs dans les neurones isolés de moustiques AcerKis. Ces nAChRs sont sensibles à de fortes concentrations d'ACh (>100 $\mu$ M) et présentent une perméabilité au calcium. Ils sont responsables d'une différence d'effet de l'ACh sur les neurones AcerKis qui se traduit par une réduction du temps au pic du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM ainsi que par une augmentation de la quantité de charge et de la densité de courant qui passe par les nAChRs. L'activation de ces récepteurs exprimés dans les neurones isolés de moustiques AcerKis provoque une dépolarisation plus importante par rapport à celle observée dans les neurones Kis. Cette dépolarisation est capable d'atteindre le seuil d'activation des canaux Cav. La **figure 77** reprend le modèle proposé dans notre étude.

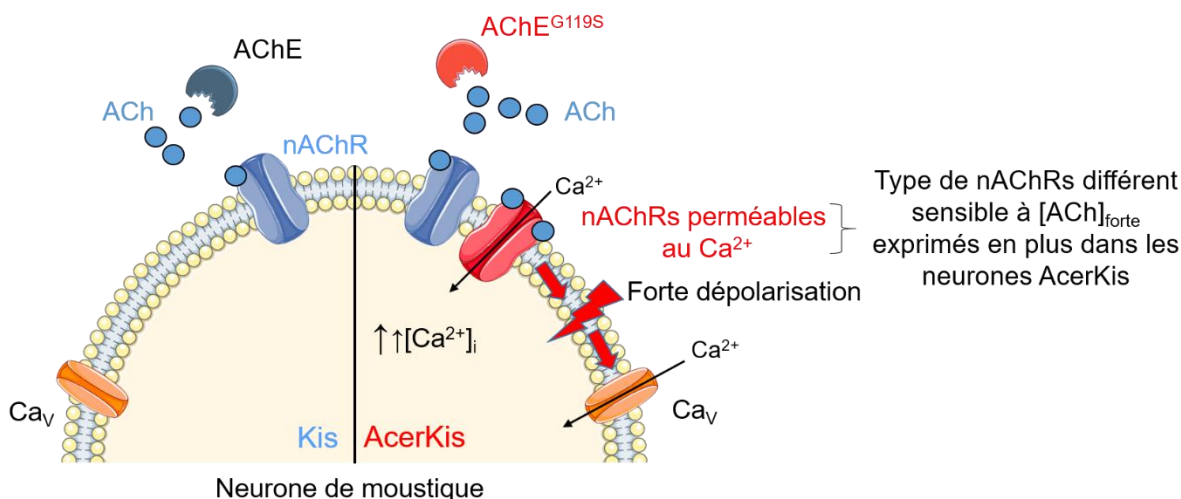


Figure 77 : Modèle des mécanismes de compensation cellulaires et moléculaires mis en place au niveau neuronal chez la souche de moustique AcerKis portant la mutation  $AChE^{G119S}$ . L'expression de nAChRs sensibles à de fortes concentrations d'ACh et perméables au calcium cause une dépolarisation du potentiel de membrane plus importante dans les neurones isolés de moustiques AcerKis que dans les neurones Kis lors de l'application d'ACh. L'activation des canaux  $Ca_v$  à haut seuil d'activation qui en résulte provoque une forte élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Le calcium serait impliqué dans la protection des nAChRs de la désensibilisation induite par une trop forte concentration d'ACh puisque l'AChE mutée présente une activité catalytique réduite qui est responsable d'une augmentation de la concentration synaptique en ACh.

L'action de l'ACh sur les nAChRs est normalement terminée par l'action catalytique de l'AChE, cependant l'activité catalytique de cette enzyme est réduite dans la souche AcerKis (Alout *et al.*, 2008 ; Perrier *et al.*, 2021). Il a été montré chez la blatte *P. americana* que l'augmentation consécutive de la concentration d'ACh dans l'espace synaptique suite à une inhibition de l'AChE induit l'activation de mAChRs de sous-type M2 présynaptiques impliqués dans la régulation négative de la libération d'ACh (Corbel *et al.*, 2006). Parallèlement, l'excès d'ACh peut induire une désensibilisation des nAChRs, ce qui altère la transmission du message nerveux (Quick et Lester, 2002 ; Dani, 2015). Malgré la résistance aux insecticides de type OP et CX qui présente un avantage pour les moustiques présentant la mutation G119S dans les zones traitées, ces derniers doivent conserver une transmission synaptique optimale pour assurer les principales fonctions physiologiques dépendantes du système cholinergique. A partir des résultats présentés, nous pouvons suggérer que l'expression d'une population supplémentaire différente de nAChRs observée chez ces moustiques est un mécanisme permettant de compenser l'augmentation de la concentration d'ACh dans l'espace synaptique. Le calcium extracellulaire passant par les nAChRs et les canaux  $Ca_v$  lors de l'application d'ACh sur les neurones AcerKis pourrait alors protéger les nAChRs d'une désensibilisation par l'agoniste (Gharpure *et al.*, 2020). Il est connu dans la

littérature que le calcium est impliqué dans la restauration de l'état fonctionnel des nAChRs suite à une désensibilisation (Lee *et al.*, 2015). Ce mécanisme de compensation réduirait donc *in fine* les effets délétères causés par la mutation G119S de l'AChE.

L'autre souche de moustique que nous avons étudiée est la souche KdrKis qui présente la mutation L1014F dans le domaine IIS6 du canal  $Na_v$  qui confère la résistance *kdr* aux pyréthriinoïdes (Dong *et al.*, 2014; Liu, 2015; Ranson, 2017). Même si la structure moléculaire des canaux  $Na_v$  des insectes, notamment d'*An. gambiae*, est bien caractérisée (Dong *et al.*, 2014; Liu, 2015; Du *et al.*, 2016), les études électrophysiologiques comparatives des propriétés biophysiques des canaux  $Na_v$  sauvages et mutés n'ont été réalisées qu'avec les gènes codant la sous-unité *para* du canal  $Na_v$  d'*A. aegypti* et de *D. melanogaster* (Vais *et al.*, 2000; Burton *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015a; Du *et al.*, 2016). Dans ces études, les gènes sont modifiés par mutagenèse dirigée et exprimés dans un système hétérologue, les ovocytes de xénope. C'est donc la première fois qu'une étude comparative est menée sur des neurones. Jusqu'à maintenant, il n'existait pas de données sur les propriétés biophysiques des canaux  $Na_v$  natifs exprimés dans les neurones isolés de moustiques *An. gambiae* souche Kis et KdrKis. Dans ce travail, nous avons mis en évidence une modification des propriétés biophysiques de l'activation mais surtout de l'inactivation à l'état stable des canaux  $Na_v$  exprimés dans les neurones isolés de moustiques KdrKis. L'existence d'une fenêtre importante de canaux ioniques qui conduisent à l'état stable (obtenue par l'intersection des courbes d'activation et d'inactivation) a pour conséquence de maintenir le potentiel de membrane au repos à une valeur plus positive sur les neurones KdrKis comparé aux neurones Kis. Cette différence dans le courant de fenêtre n'avait pas été reportée avec des canaux  $Na_v$  de *D. melanogaster* mutés en position 1014 (DIIS6) exprimés dans des ovocytes de xénope (Burton *et al.*, 2011). La dépolarisation des neurones KdrKis réduit le pourcentage de canaux  $Ca_v$  activables. En effet, dans ce cas, seulement 80% des canaux  $Ca_v$  sont susceptibles d'être activés lors de la stimulation. Bien que nous avons montré l'existence des canaux  $Na_v$  et  $Ca_v$  impliqués dans l'activité électrophysiologique des neurones de moustiques, nous n'avons pas caractérisé l'activité électrique (e.g. décours du PA, espèces et canaux ioniques impliqués dans ce décours). De plus, nous travaillons uniquement au niveau somatique puisque les arborisations neuritiques sont détruites lors de la dissociation cellulaire. On peut alors se demander quel est le lien entre l'inactivation de 20% des canaux  $Ca_v$  et l'augmentation de l'efficacité des nAChRs pour de faibles concentrations d'ACh dans les neurones KdrKis. Le calcium intervient à plusieurs niveaux dans la libération des neurotransmetteurs. Premièrement, le calcium est impliqué dans la régulation de l'activité des protéines moteurs comme la kinésine qui permet le transport des vésicules de sécrétion d'ACh du soma jusqu'au bouton synaptique (Wang

et Schwarz, 2009; Hirokawa *et al.*, 2010). Deuxièmement, le rôle des canaux  $Ca_v$  dans la sécrétion rapide des neurotransmetteurs au niveau présynaptique en réponse à un stimulus tel qu'un PA est bien connu dans la littérature (Dolphin et Lee, 2020). L'entrée de calcium résultant de l'activation des canaux  $Ca_v$  au niveau présynaptique lors de l'arrivée des PAs permet la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique et la libération du neurotransmetteur (He *et al.*, 2018). En s'appuyant sur ces données, nous pouvons supposer que la réduction du nombre de canaux  $Ca_v$  susceptibles d'être activés causée par la dépolarisation provoque une diminution de la sécrétion d'ACh dans la fente synaptique *in vivo* et qu'une plus faible concentration d'ACh atteint les nAChRs sur les neurones des moustiques KdrKis que sur les neurones Kis. Dans ce cas, l'augmentation de la réponse des nAChRs à de faibles concentrations d'ACh serait un mécanisme de compensation/régulation pour maintenir les fonctions physiologiques optimales dans les neurones KdrKis (**Figure 78**).

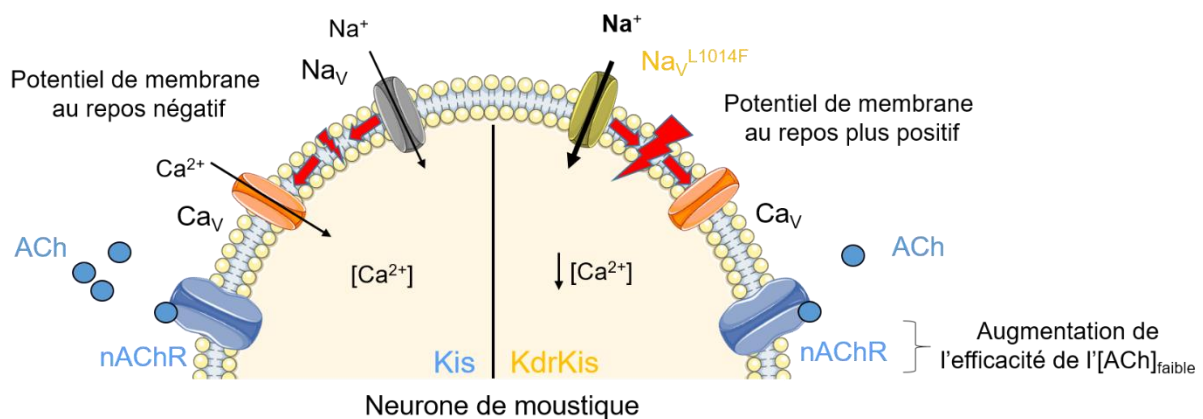


Figure 78 : Modèle des mécanismes de compensation cellulaires et moléculaires mis en place au niveau neuronal chez la souche de moustique KdrKis portant la mutation  $Na_v^{L1014F}$ . La modification des propriétés de l'inactivation des canaux  $Na_v$  induit un influx sodique à l'état stable plus important dans les neurones isolés de moustiques KdrKis que dans les neurones Kis. Dans ce cas, le potentiel de membrane au repos est plus positif. Cette valeur plus positive du potentiel de membrane est responsable d'une réduction de 20% du nombre de canaux  $Ca_v$  activables et, par conséquent, pourrait être à l'origine d'une diminution de la libération d'ACh au niveau présynaptique. L'augmentation de la réponse des nAChRs observée pour de faibles concentrations d'ACh permettrait de compenser cette diminution de la concentration en ACh dans l'espace synaptique.

Basé sur l'ensemble des résultats, une perspective de recherche à ce niveau est la caractérisation des sous-types de nAChRs différemment exprimés dans les neurones de ces trois souches. Cependant, l'assemblage en sous-unité des nAChRs exprimés à la membrane dans les neurones des trois souches est inconnue. Il serait donc important de quantifier l'expression de



chacune des sous-unités nicotiques ( $\alpha 1$  à  $\alpha 9$  et  $\beta 1$ ) et d'utiliser des ARN interférents spécifiques de ces sous-unités pour évaluer l'impact de la diminution de l'expression de chacune d'elles sur les courants ioniques induits par l'ACh ou d'autres agonistes des nAChRs (e.g. néonicotinoïdes).

Concernant les mécanismes de compensation associés à des résistances par mutation de la cible de l'insecticide sont caractérisés, il est important de ne plus considérer désormais les résistances par mutation de la cible comme étant simplement la mutation d'une protéine. Au contraire, les mutations induisent des chaînes d'évènements intracellulaires qui visent à compenser les effets qui resteraient délétères si elles n'étaient pas développées. Il n'est pas si étonnant qu'une mutation mise en jeu par un insecte qui devient résistant aux insecticides altère le système cholinergique puisqu'il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques chez les insectes comme le développement, l'intégration des signaux sensoriels, l'activité locomotrice et cognitive (Henry *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2014; Grünewald et Siefert, 2019; Tison *et al.*, 2019). Par exemple, une étude de RNA-Seq a prouvé très récemment que les gènes qui codent les sous-unités de nAChRs étaient tous surexprimées dans deux souches résistantes de moustique *An. gambiae*, une souche résistante à la deltaméthrine et l'autre à la CLO (Zoh *et al.*, 2021), par rapport à la souche sensible de référence. Plus important encore, nous montrons que les mécanismes de compensation physiologique peuvent impacter l'effet de certains insecticides, ce qui renforce la nécessité de les prendre en considération pour adapter des stratégies de lutte basées sur l'utilisation des insecticides.

Nous avons, en effet, montré que l'effet de la CLO était différent entre la souche sensible de référence Kis, et les souches résistantes AcerKis et KdrKis. A la fois *in vitro* sur l'élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  et *in vivo* sur la mortalité des larves, la CLO a démontré une efficacité plus importante sur la souche AcerKis que sur les deux autres souches, et une efficacité moindre sur la souche KdrKis par rapport aux souches Kis et AcerKis. En 2004, l'équipe de Hougard et ses collaborateurs avait obtenu des résultats similaires en testant le dinotéfuran, un insecticide néonicotinoïde sur plusieurs espèces de moustiques au stade larvaire dans les mêmes conditions expérimentales (Corbel *et al.*, 2004). Ils ont montré sur *C. quinquefasciatus* que le dinotéfuran est plus efficace sur les larves de la souche mutée sur l'AChE résistante aux OP et CX (souche RLAB ;  $CL_{50}$  : 0,14mg/L) par rapport à la souche sensible de référence (souche SLAB ;  $CL_{50}$  : 0,34mg/L) après 24h d'exposition. De plus, sur *C. quinquefasciatus* et *A. aegypti*, le dinotéfuran est moins efficace sur la souche mutée sur le canal  $Na_v$  résistante aux pyréthriinoïdes (respectivement souche BKPER ;  $CL_{50}$  : 0,44mg/L ; et LHP ;  $CL_{50}$  : 0,40mg/L) par rapport à la souche sensible de référence (respectivement souche SLAB ;  $CL_{50}$  : 0,34mg/L ; et BORA ;  $CL_{50}$  : 0,21mg/L).

Etonnamment, la souche d'*An. gambiae* mutée sur le canal Na<sub>v</sub> résistante aux pyréthriinoïdes (souche VKPER ; CL<sub>50</sub> : 0,17mg/L) ne montre pas de différence de sensibilité vis-à-vis du dinotéfuran comparé à la souche sensible de référence (souche Kis ; CL<sub>50</sub> : 0,17mg/L), mais ces deux souches n'avaient pas le même fond génétique comme c'est le cas dans notre étude.

Par contre, nous avons pu montrer que le TRIF, un insecticide mésoionique qui n'a jamais été testé en LAV et en particulier sur des souches de moustiques résistants, ne présente pas une efficacité différente entre les souches Kis, AcerKis et KdrKis *in vitro* et *in vivo*. L'effet de cet insecticide est conservé malgré l'existence des mécanismes physiologiques de compensation qui touchent les nAChRs que nous avons mis en évidence dans les souches de moustiques résistantes. A la différence de CLO, cet insecticide agit comme un antagoniste compétitif des nAChRs qui est capable de déplacer l'imidaclopride et l'ACh sur le site orthostérique (Zhang *et al.*, 2016; Holyoke *et al.*, 2017; Casida, 2018).

En se basant sur ces résultats, de futures expérimentations devront être menées pour comprendre la différence d'effet de la CLO sur les neurones Kis, AcerKis et KdrKis. L'efficacité de l'insecticide pourrait, au niveau cellulaire et moléculaire, être influencée par de nombreux facteurs comme la perméabilité au calcium de certains sous-types de nAChRs ou la régulation par les voies de signalisation intracellulaire dépendante du calcium des nAChRs. L'effet différent de l' $\alpha$ -bgt sur les neurones KdrKis permet de supposer que la stœchiométrie de ces récepteurs est modifiée dans les neurones de moustiques résistants par rapport aux neurones de la souche sensible de référence. Ensuite, il faudra comprendre pourquoi l'effet du TRIF, qui cible pourtant les mêmes récepteurs, n'est pas différent entre les trois souches de moustiques.

L'utilisation de ces deux insecticides disposant d'un mode d'action différent (la CLO étant un agoniste plein et le TRIF étant un antagoniste compétitif) en LAV est totalement justifiée dans le contexte actuel d'émergence et de diffusion des résistances aux insecticides. L'affinité de la CLO est 605 fois plus importante pour les nAChRs d'insecte que pour les nAChRs de mammifères, ce qui démontre la haute spécificité des néonicotinoïdes. De plus, l'efficacité de la CLO est avérée en larvicide et en adulticide sur des souches de moustiques *A. aegypti* résistantes (Darriet et Chandre, 2013). Cet insecticide a été identifié comme adulticide le plus efficace contre *C. quinquefasciatus* après le chlorfénapyr parmi 25 insecticides testés (Shah *et al.*, 2016) et a été évalué comme étant l'insecticide le plus intéressant à utiliser en lutte adulticide contre *An. gambiae* parmi plus de 600 insecticides et acaricides (Lees *et al.*, 2019). Dans cette même étude, le TRIF a été classé comme l'une des 10 molécules les plus efficaces contre *An. gambiae* (Lees

*et al.*, 2019). En outre, le TRIF garde la même efficacité sur des souches de *Nilaparvata Lugens* résistantes aux néonicotinoïdes, notamment à la CLO (Liao *et al.*, 2021).

Nos résultats ouvrent des perspectives de recherche qui viseraient à caractériser les changements dans l'expression de protéines d'intérêt pour la LAV. Puisque nous montrons que le changement totalement inattendu des propriétés électropharmacologiques des nAChRs dans les souches de moustiques résistants permet d'adapter des stratégies de LAV, il est tout à fait possible que d'autres cibles moléculaires soient altérées dans leur niveau d'expression ou dans leurs propriétés fonctionnelles. Zoh et collaborateurs ont par exemple montré, dans deux souches résistantes de moustique *An. Gambiae*, une souche résistante à la deltaméthrine et l'autre à la CLO, des modifications du niveau d'expression des gènes qui codent des enzymes de détoxification comme les cytochromes P450 et les carboxylestérases, des protéines qui interagissent avec la chitine qui compose la cuticule comme les CPFL, et des transporteurs comme les cassettes ABC (Zoh *et al.*, 2021). De plus, nous avons découvert des mécanismes de compensation dans des souches de moustiques *An. gambiae* qui ne présentent qu'un seul mécanisme de résistance. Or sur le terrain, nombreuses sont les populations de moustiques qui possèdent de manière concomitante plusieurs mécanismes de résistance différents. Par exemple, les mutations G119S et L1014F étudiées dans cette thèse peuvent être retrouvées au sein du même individu (Assogba *et al.*, 2014). De même, il est connu que les résistances par mutation de cible sont souvent accompagnées par des mécanismes de résistance métabolique au sein d'un individu (Kwiatkowska *et al.*, 2013; Edi *et al.*, 2014; Oumbouke *et al.*, 2020). Le niveau de complexité des mécanismes de compensation cellulaires et moléculaires qui peuvent être mis en place chez les moustiques présentant une résistance multiple est très élevé et doit être pris en compte pour développer et adapter de futures stratégies de LAV. On peut aussi se demander si ces mécanismes de compensation existent et s'ils sont identiques dans d'autres espèces de moustiques qui présentent des résistances aux insecticides résultant d'une mutation de cible. Par exemple, il est connu que d'autres espèces de moustiques présentent la résistance *kdr* par d'autres mutations du canal Na<sub>v</sub>, comme S989P, I1011M/V, V1016G/I, F1534L/C/S, F1239C, V410L, D1763Y, A1007G chez *A. aegypti* (Zuharah et Sufian, 2021) et V1016G, F1534L/C/S, I1532T chez *A. albopictus* (Zhou *et al.*, 2019).

## 2. L'IR3535 comme agent synergisant : optimisation de l'effet des insecticides qui agissent sur les nAChRs

Dans le contexte actuel en LAV, il est urgent de proposer d'autres molécules utilisables pour diversifier l'arsenal larvicide. En effet, à force d'y être exposé, il est possible que des résistances émergent chez les moustiques vis-à-vis des molécules à effet larvicide. Par exemple, la résistance au téméphos, un OP qui a été utilisé en tant que larvicide, est avérée chez *A. aegypti* (Valle *et al.*, 2019) et peut être sélectionnée chez *An. stephensi* en laboratoire en seulement 10 générations (Vivekanandhan *et al.*, 2021). De même, la résistance au diflubenzuron, un inhibiteur de la biosynthèse de la chitine, est avérée chez *C. pipiens* (Grigoraki *et al.*, 2017). Enfin, le pyriproxifène, un inhibiteur de croissance utilisé en larvicide, est métabolisé par les enzymes cytochromes P450 surexprimées dans les populations d'*An. gambiae* qui présentent une résistance métabolique aux pyréthrinoïdes et qui posent de plus en plus de problèmes en santé publique (Yunta *et al.*, 2016). Il a même été montré récemment que l'exposition à des doses sub-léthales de pyriproxifène des larves d'*An. arabiensis* semble renforcer la résistance aux pyréthrinoïdes, mais pas au DDT ou aux insecticides CX, au stade adulte après l'émergence (Opiyo *et al.*, 2021). En s'appuyant sur nos résultats, la CLO et le TRIF sont de très bons candidats à proposer en lutte larvicide grâce à leur efficacité sur les larves d'*An. gambiae* souche sensible et résistantes et aux possibilités d'optimisation du traitement par l'association avec un agent synergisant.

De plus, il est possible d'augmenter l'efficacité des insecticides qui agissent sur les nAChRs grâce à l'utilisation d'un agent synergisant qui active des voies de signalisation intracellulaires calcium-dépendantes (Deshayes *et al.*, 2018; El-Adouzi *et al.*, 2020; Moreau *et al.*, 2020). Pour rappel, le répulsif IR3535 a été choisi pour remplir ce rôle grâce à sa spécificité pour les insectes et l'absence d'effets secondaires connus aujourd'hui contrairement au DEET. Il a été montré que l'IR3535 peut, à une concentration sub-répulsive très faible et sans activité insecticide propre, induire une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les neurones de blatte *P. americana* mais aussi de moustiques Kis et AcerKis suffisante pour potentialiser l'effet du thiaclopride et du thiaméthoxame, deux insecticides néonicotinoïdes (El-Adouzi *et al.*, 2020; Moreau *et al.*, 2020). Le DEET a déjà été utilisé en tant qu'agent synergisant pour induire une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  à faible concentration *in vitro* sur neurones DUM de blatte mais le pic maximum de variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  est obtenu pour une concentration de 100nM contre 10nM pour l'IR3535 (Abd-Ella *et al.*, 2015; Moreau *et al.*, 2020). De plus, l'IR3535 agit à une concentration encore plus faible sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. Le pic maximum de variation de

la  $[Ca^{2+}]_i$  est obtenu pour une concentration de 0,1nM sur les neurones de moustiques (El-Adouzi *et al.*, 2020). Il faut noter que la courbe effet-log concentration d'IR3535 présente un décours en cloche atypique pour de faibles concentrations sur les neurones DUM de blatte et sur les neurones de moustiques Kis et AcerKis (El-Adouzi *et al.*, 2020; Moreau *et al.*, 2020). Pour des concentrations plus faibles ou plus fortes que 10nM sur neurones de blatte et 0,1nM sur neurones de moustiques, les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  sont fortement réduites.

Dans notre étude, l'IR3535 a un effet synergique très significatif *in vivo* avec la CL<sub>50</sub> et la CL<sub>30</sub> à 48h de la CLO sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis dans la gamme de concentration testée. Les effets synergiques les plus forts sont obtenus pour des concentrations de 3 à 4g/L d'IR3535 en association avec la CLO à la CL<sub>50</sub> sur les larves Kis, AcerKis et KdrKis que ce soit après 24 ou 48h d'exposition. Par exemple, sur les larves de la souche Kis, la mortalité est en moyenne de 4,7% pour la CLO à la CL<sub>50</sub> à 48h seule contre 33,3% pour l'association avec l'IR3535 à 3g/L après 24h d'exposition. Après 48h d'exposition, elle est de 56% pour la CLO seule contre 81% pour l'association avec l'IR3535 à 3g/L. Sur les larves de la souche AcerKis, la mortalité est en moyenne de 7,7% pour la CLO seule contre 30,5% pour l'association avec l'IR3535 à 3g/L après 24h d'exposition. Après 48h d'exposition, elle est de 46,5% pour la CLO seule contre 81,3% pour l'association avec l'IR3535 à 3g/L. Enfin, sur les larves de la souche KdrKis, la mortalité est en moyenne de 10,4% pour la CLO seule contre 60,7% pour l'association avec l'IR3535 à 3g/L après 24h d'exposition. Après 48h d'exposition, elle est de 55,1% pour la CLO seule contre 92,0% pour l'association avec l'IR3535 à 3g/L. Ce constat est le même lorsque l'IR3535 est associé à la CLO à la CL<sub>30</sub> excepté sur la souche Kis où la concentration optimale d'IR3535 est de 2 à 3g/L.

Ces résultats positionnent l'IR3535 comme un agent synergisant de choix pour développer et optimiser de nouvelles stratégies de lutte chimique. Cependant, nous avons observé que l'effet synergique peut présenter une certaine hétérogénéité entre les souches pour la même concentration d'IR3535 et de CLO. Dans notre stratégie, le contrôle de la  $[Ca^{2+}]_i$  est un élément primordial pour le succès de la potentialisation de l'effet insecticide et pour ne pas induire un effet antagoniste. Cet effet antagoniste a déjà été montré *in vitro* dans les neurones DUM de blatte *P. americana*. Dans ce modèle, l'IR3535 potentialise l'effet du thiaclopride dans une gamme de concentrations de 10nM à 1µM alors qu'à plus forte concentration l'effet insecticide est réduit (Moreau *et al.*, 2020). Or, l'IR3535 est responsable d'une élévation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en tant qu'agent synergisant, mais il a été prouvé que la CLO était également responsable d'une entrée de calcium dans le même modèle neuronal et sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis (Calas-

List *et al.*, 2013; El-Adouzi *et al.*, 2020). Selon la souche de moustique et les concentrations d'IR3535 et de CLO utilisées, la  $[Ca^{2+}]_i$  pourrait, par exemple, être trop faible pour potentialiser l'effet insecticide. Comme indiqué dans l'introduction, il a été montré sur les neurones DUM de la blatte *P. americana* et sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis que l'IR3535 a un effet non monotone sur l'élévation de calcium intracellulaire en fonction de la concentration. On peut donc penser que l'effet non monotone de l'IR3535 est aussi impliqué dans l'hétérogénéité de l'effet synergique observée en fonction de la concentration de CLO et de la souche de moustique. En prenant en considération ces données, il n'est donc pas étonnant que selon le ratio de concentration entre l'IR3535 et la CLO, l'effet synergique ne soit pas toujours observé.

De futures expérimentations devront être réalisées afin de déterminer le ratio de concentration entre l'IR3535 et le néonicotinoïde le plus optimal pour éviter d'atteindre un effet antagoniste. Ce ratio doit permettre de contrôler les populations d'*An. gambiae* à la fois sensibles et résistantes aux insecticides en utilisant les concentrations les plus faibles de chacun des composés démontrant une efficacité maximale.

Nos résultats préliminaires montrent que dans la gamme de concentrations d'IR3535 testée, celui-ci induit systématiquement une potentialisation de l'effet du TRIF à la CL<sub>50</sub> à 48h sur les larves de moustiques Kis. L'effet synergique le plus important est obtenu pour une concentration de 3g/L d'IR3535 en association avec le TRIF qui induit une mortalité de 41,2% contre 14,0% pour le TRIF seul après 24h d'exposition. Après 48h d'exposition, la mortalité à la même concentration est de 73,9% pour l'association contre 36% pour la TRIF seul. Encore une fois, l'IR3535 joue parfaitement son rôle d'agent synergisant pour un insecticide qui agit sur les nAChRs. Dans des expérimentations futures, il sera impératif de tester la combinaison de l'IR3535 et du TRIF sur les larves de moustiques AcerKis et KdrKis puisque ce sont ces souches résistantes aux insecticides qui présentent le plus d'intérêt en santé publique. En nous appuyant sur les résultats que nous avons obtenus *in vitro* sur les neurones isolés de deux souches de moustiques résistantes, il paraît raisonnable de penser que la combinaison avec l'IR3535 potentialisera l'effet du TRIF de la même manière pour les larves résistantes.

Les résultats obtenus *in vivo* sont très encourageants et confortent le principe d'utiliser des agents synergisants pour optimiser l'efficacité des insecticides. L'association du TRIF ou de la CLO avec l'IR3535 est donc une piste à explorer pour développer de nouvelles stratégies de LAV. L'étude des effets d'une triple association de ces composés pourrait constituer un projet de

recherche qui aurait pour but d'améliorer l'effet insecticide et de réduire les concentrations utilisées.

A l'issu de ce travail de thèse, comme indiqué ci-dessus, de nombreuses perspectives de recherche sont envisagées. Pour limiter un éventuel effet répulsif et prolonger l'effet de l'association IR3535/CLO et IR3535/TRIF, des procédés de micro- ou de nanoencapsulation peuvent être utilisés. Le DEET a déjà été microencapsulé et a montré que les moustiquaires imprégnées avec ces microcapsules conservent leur efficacité plus longtemps contre *A. albopictus* et pour un grand nombre de lavages (Yao *et al.*, 2015). Ce procédé pourrait donc être rapporté à l'IR3535 et aux insecticides que nous avons utilisés dans nos travaux. De plus, un nouveau procédé de formulation en spray nommé FFAST pour « Film Forming Aqueous Spray » a été récemment développé par Bayer pour la deltaméthrine. Les gouttelettes, contenant la formulation, émises par la buse des pulvérisateurs sont recouvertes par de longues chaînes alcool qui limitent l'évaporation et ralentissent la diffusion des insecticides dans le milieu. Les associations IR3535/CLO ou IR3535/TRIF pourront être testées en application larvicide dans des gîtes larvaires naturels ou artificiels représentatifs dans des conditions expérimentales contrôlées (OMS, 2005). Concernant la lutte aduicide, il a déjà été montré que la CLO et le TRIF sont adaptés pour être utilisés avec le RME (Rapeseed Methyl Ester), un adjuvant qui agit comme mouillant et adhésif sur de nombreuses surfaces (Lees *et al.*, 2019). Comme dit précédemment, l'effet des formulations à base de CLO en pulvérisation intra-domiciliaire comme SumiShield® 50WG et Fludora™ Fusion WP-SB est déjà connue, mais pas celui des associations IR3535/CLO ou IR3535/TRIF qui pourraient être très prometteuses pour ce type d'application. La première étape serait donc de mener des bioessais qui évaluent l'efficacité de l'association *via* le contact tarsal (Lees *et al.*, 2019). Il existe des tests de sensibilité aux insecticides développés par l'OMS réalisés dans des tubes contenant des papiers imprégnés d'insecticides. D'autres tests ont été développés par le CDC et sont réalisés dans des bouteilles dont la paroi interne est imprégnée avec les insecticides. Des doses diagnostiques qui tuent 100% des moustiques après un temps d'exposition donné peuvent alors être déterminées. Plus largement, il faudrait tester leur efficacité sur d'autres espèces vectrices d'agents pathogènes d'anophèles, d'*Aedes* et de *Culex*, sur des souches sensibles et résistantes aux insecticides.

Enfin, même si la fréquence de la résistance aux néonicotinoïdes est faible au moment du déploiement de stratégies basées sur ces insecticides, il est primordial d'implémenter ces nouvelles stratégies de manière raisonnée et d'anticiper l'émergence de résistances. Des tests sur le terrain permettraient de suivre la résistance aux néonicotinoïdes qui existe à faible

fréquence dans les populations d'anophèles sauvages (Fouet *et al.*, 2020; Zoh *et al.*, 2021). Bien que les néonicotinoïdes ne soient pas encore beaucoup utilisés en LAV, ils sont encore fréquemment utilisés en agriculture sans restrictions en Afrique et les moustiques sauvages y sont exposés en petites quantités. Avant d'être utilisée sur le terrain, toute formulation doit montrer un profil écotoxicologique acceptable. Pour évaluer ce profil, des tests OCDE sur organismes aquatiques tels que les chironomes et les daphnies, ainsi que des tests écotoxicologiques sur abeilles devront être réalisés (OECD, 2012; Ducrot *et al.*, 2014).

## Conclusions

Nous rapportons pour la première fois l'existence de mécanismes de compensation cellulaires et moléculaires qui affectent les propriétés fonctionnelles des nAChRs exprimés par les neurones isolés de moustiques résistants qui présentent des mutations qui ne touchent pas ces récepteurs. Il faut noter que ces mécanismes sont spécifiques et différents entre les deux souches résistantes étudiées dans ce travail et qu'ils modulent l'effet de certains insecticides. Cela nous pousse à reconsidérer la résistance par mutation de cible comme étant plus qu'une substitution d'un acide aminé par un autre qui réduit son affinité avec l'insecticide.

En se basant sur les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse, nous pouvons proposer deux stratégies solides totalement nouvelles en LAV basées sur l'utilisation de la CLO et du TRIF en association avec l'IR3535 sur les larves de moustiques. Ces stratégies doivent être sérieusement considérées dans des plans de lutte intégrée et en rotation avec d'autres insecticides. La lutte larvicide est en effet très complémentaire à l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides et des pulvérisations intra-domiciliaires pour atteindre un haut niveau de contrôle des populations de moustiques vecteurs d'agents pathogènes.



## Bibliographie

- Abbott, W.S. (1925). A methode for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* *18*, 265–267.
- Abd-Ella, A., Stankiewicz, M., Mikulska, K., Nowak, W., Pennetier, C., Goulu, M., Fruchart-Gaillard, C., Licznar, P., Apaire-Marchais, V., List, O., et al. (2015). The repellent DEET potentiates carbamate effects via insect muscarinic receptor interactions: An alternative strategy to control insect vector-borne diseases. *PLoS One* *10*, 1–20.
- Ahmad, M., Denholm, I., and Bromilow, R.H. (2006). Delayed cuticular penetration and enhanced metabolism of deltamethrin in pyrethroid-resistant strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag. Sci.* *62*, 805–810.
- Aïzoun, N., Aïkpon, R., Padonou, G.G., Oussou, O., Oké-Agbo, F., Gnanguenon, V., Ossè, R., and Akogbéto, M. (2013). Mixed-function oxidases and esterases associated with permethrin, deltamethrin and bendiocarb resistance in *Anopheles gambiae* s.l. in the south-north transect Benin, West Africa. *Parasites Vectors* *2013* *6*, 1–11.
- Alout, H., Djogbéno, L., Berticat, C., Chandre, F., and Weill, M. (2008). Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties.
- Alout, H., Ndam, N.T., Sandeu, M.M., Djégbe, I., Chandre, F., Dabiré, R.K., Djogbéno, L.S., Corbel, V., and Cohuet, A. (2013). Insecticide Resistance Alleles Affect Vector Competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* Field Isolates. *PLoS One* *8*, e63849.
- Alout, H., Yameogo, B., Djogbéno, L.S., Chandre, F., Dabiré, R.K., Corbel, V., and Cohuet, A. (2014a). Interplay between *Plasmodium* infection and resistance to insecticides in vector mosquitoes. *J. Infect. Dis.* *210*, 1464–1470.
- Alout, H., Djègbè, I., Chandre, F., Djogbéno, L.S., Dabiré, R.K., Corbel, V., and Cohuet, A. (2014b). Insecticide exposure impacts vector- parasite interactions in insecticide-resistant malaria vectors. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *281*.
- Alout, H., Dabiré, R.K., Djogbéno, L.S., Abate, L., Corbel, V., Chandre, F., and Cohuet, A. (2016). Interactive cost of *Plasmodium* infection and insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Sci. Rep.* *6*, 1–11.
- Alout, H., Roche, B., Dabiré, R.K., and Cohuet, A. (2017). Consequences of insecticide resistance on malaria transmission. *PLoS Pathog.* *13*.
- Alzogaray, R.A. (2016). Behavioral and toxicological responses of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) to the insect repellents DEET and IR3535. *J. Med. Entomol.* *53*, 387–393.
- Anses (2016). Avis relatif à l'actualisation de substances actives et produits biocides potentiellement intéressants pour une utilisation en lutte anti-vectorielle. 1–54.

- Aoun, O., Roqueplo, C., and Rapp, C. (2014). Spectrum and impact of health problems during deployment: A prospective, multicenter study of French soldiers operating in Afghanistan, Lebanon and Côte d'Ivoire. *Travel Med. Infect. Dis.* 12, 378–384.
- 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. *Environ. Microbiol. Rep.* 8, 168–178.
- Assogba, B.S., Djogbénu, L.S., Saizonou, J., Milesi, P., Djossou, L., Djegbe, I., Oumbouke, W.A., Chandre, F., Baba-Moussa, L., Weill, M., et al. (2014). Phenotypic effects of concomitant insensitive acetylcholinesterase (ace-1(R)) and knockdown resistance (kdr(R)) in *Anopheles gambiae*: a hindrance for insecticide resistance management for malaria vector control. *Parasit. Vectors* 7, 548.
- Baik, L.S., and Carlson, J.R. (2020). The mosquito taste system and disease control. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 32848–32856.
- Balabanidou, V., Kampouraki, A., Maclean, M., Blomquist, G.J., Tittiger, C., Juárez, M.P., Mijailovsky, S.J., Chalepakis, G., Anthousi, A., Lynd, A., et al. (2016). Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 9268–9273.
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., and Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Curr. Opin. Insect Sci.* 27, 68–74.
- Balabanidou, V., Kefi, M., Aivaliotis, M., Koidou, V., Girotti, J.R., Mijailovsky, S.J., Patricia Juárez, M., Papadogiorgaki, E., Chalepakis, G., Kampouraki, A., et al. (2019). Mosquitoes cloak their legs to resist insecticides. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286.
- Barredo, E., and Degennaro, M. (2020). Not Just from Blood: Mosquito Nutrient Acquisition from Nectar Sources.
- Beadle, D.J. (2006). Insect neuronal cultures: An experimental vehicle for studies of physiology, pharmacology and cell interactions. *Invertebr. Neurosci.* 6, 95–103.
- Bkhache, M., Tmimi, F.Z., Charafeddine, O., Filali, O.B., Lemrani, M., Labbé, P., and Sarih, M. (2019). G119S ace-1 mutation conferring insecticide resistance detected in the *Culex pipiens* complex in Morocco. *Pest Manag. Sci.* 75, 286–291.
- 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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 341, 326–339.
- Bohbot, J.D., and Dickens, J.C. (2010). Insect Repellents: Modulators of Mosquito Odorant Receptor Activity. *PLoS One* 5, e12138.
- Bollimuntha, S., Pani, B., and Singh, B.B. (2017). Neurological and motor disorders: Neuronal store-operated Ca<sup>2+</sup> signaling: An overview and its function. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, (Springer New York LLC), pp. 535–556.

- Bonizzoni, M., Afrane, Y., Dunn, W.A., Atieli, F.K., Zhou, G., Zhong, D., Li, J., Githeko, A., and Yan, G. (2012). Comparative Transcriptome Analyses of Deltamethrin-Resistant and -Susceptible *Anopheles gambiae* Mosquitoes from Kenya by RNA-Seq. *PLoS One* 7, 44607.
- Bonnet, J., Pennetier, C., Duchon, S., Lapied, B., and Corbel, V. (2009). Multi-function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitoes. *Parasit. Vectors*.
- Bouhsira, E., Fysikopoulos, A., and Franc, M. (2009). Efficacy of fipronil-(S)-methoprene, metaflumizone combined with amitraz, and pyriprole commercial spot-on products in preventing *Culex pipiens pipiens* from feeding on dogs. *Vet. Rec.* 165, 135–137.
- Bourdin, C.M., Moignot, B., Wang, L., Murillo, L., Juchaux, M., Quinchar, 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.
- Bourdin, C.M., Guérineau, N.C., Murillo, L., Quinchar, S., Dong, K., and Legros, C. (2015). Molecular and functional characterization of a novel sodium channel TipE-like auxiliary subunit from the American cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 66, 136–144.
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., and Carafoli, E. (2013). Intracellular calcium homeostasis and signaling. *Met. Ions Life Sci.* 12, 119–168.
- Brown, L.A., Ihara, M., Buckingham, S.D., Matsuda, K., and Sattelle, D.B. (2006). Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* 99, 608–615.
- Burton, M.J., Mellor, I.R., Duce, I.R., Davies, T.G.E., Field, L.M., and Williamson, M.S. (2011). Differential resistance of insect sodium channels with *kdr* mutations to deltamethrin, permethrin and DDT. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 723–732.
- Calas-List, D., List, O., Quinchar, S., and Thany, S.H. (2013). Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Neurotoxicology* 37, 127–133.
- Carrier, P.R., Bloomquist, J.R., Totrov, M., and Li, J. (2017). Discovery of Species-selective and Resistance-breaking Anticholinesterase Insecticides for the Malaria Mosquito. *Curr. Med. Chem.* 24, 2946.
- Carnevale, P., and Robert, V. (2009). Les anophèles.
- Carrasco-Escobar, G., Manrique, E., Ruiz-Cabrejos, J., Saavedra, M., Alava, F., Bickersmith, S., Prussing, C., Vinetz, J.M., Conn, J.E., Moreno, M., et al. (2019). High-accuracy detection of malaria vector larval habitats using drone-based multispectral imagery. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007105.
- Carrasco, D., Lefèvre, T., Moiroux, N., Pennetier, C., Chandre, F., and Cohuet, A. (2019). Behavioural adaptations of mosquito vectors to insecticide control. *Curr. Opin. Insect Sci.* 34, 48–54.

- Casida, J.E. (2018). Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators: Progress and Prospects. *Annu. Rev. Entomol.* 63, 125–144.
- Casida, J.E., and Durkin, K.A. (2013). Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117.
- Casida, J.E., and Quistad, G.B. (2004). Organophosphate toxicology: Safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 983–998.
- Catry, T., Li, Z., Roux, E., Herbreteau, V., Gurgel, H., Mangeas, M., Seyler, F., and Dessay, N. (2018). Wetlands and Malaria in the Amazon: Guidelines for the Use of Synthetic Aperture Radar Remote-Sensing. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 468.
- Chaisson, K.E., and Hallem, E.A. (2012). Chemosensory behaviors of parasites. *Trends Parasitol.* 28, 427.
- Changeux, J.P. (2018). The nicotinic acetylcholine receptor: A typical 'allosteric machine.' *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 373.
- Cheung, J., Mahmood, A., Kalathur, R., Liu, L., and Carlier, P.R. (2018). Structure of the G119S Mutant Acetylcholinesterase of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Reveals Basis of Insecticide Resistance. *Structure* 26, 130-136.e2.
- Chukwuekezie, O., Nwosu, E., Nwangwu, U., Dogunro, F., Onwude, C., Agashi, N., Ezihe, E., Anioke, C., Anokwu, S., Eloy, E., et al. (2020). Resistance status of *Anopheles gambiae* (s.l.) to four commonly used insecticides for malaria vector control in South-East Nigeria. *Parasites Vectors* 2020 131 13, 1–10.
- Churcher, T.S., Lissenden, N., Griffin, J.T., Worrall, E., and Ranson, H. (2016). The impact of pyrethroid resistance on the efficacy and effectiveness of bednets for malaria control in Africa. *Elife* 5.
- CNEV (2014). Utilisation des insecticides et gestion de la résistance. 70.
- CNEV (2016). Guide à l'attention des collectivités.
- Coetzee, M., Hunt, R.H., Wilkerson, R., Torre, A. Della, Coulibaly, M.B., and Besansky, N.J. (2013). *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex.
- Corbel, V., Chandre, F., Darriet, F., Lardeux, F., and Hougard, J.M. (2003). Synergism between permethrin and propoxur against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Med. Vet. Entomol.* 17, 158–164.
- Corbel, V., Duchon, S., Zaim, M., and Hougard, J.-M. (2004). Dinotefuran: a potential neonicotinoid insecticide against resistant mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 41, 712–717.
- Corbel, V., Stankiewicz, M., Bonnet, J., Grolleau, F., Hougard, J.M., and Lapied, B. (2006). Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *Neurotoxicology* 27, 508–519.

- Corbel, V., Stankiewicz, M., Penner, C., Fournier, D., Stojan, J., Girard, E., Dimitrov, M., Molgó, J., Hougard, J.M., and Lapied, B. (2009). Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biol.* 7, 47.
- Cordova, D., Benner, E.A., Schroeder, M.E., Holyoke, C.W., Zhang, W., Pahutski, T.F., Leighty, R.M., Vincent, D.R., and Hamm, J.C. (2016). Mode of action of triflumezopyrim: A novel mesoionic insecticide which inhibits the nicotinic acetylcholine receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 74, 32–41.
- 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). *Mol. Pharmacol.* 60, 80–91.
- Créach, M.A., Velut, G., De Laval, F., Briolant, S., Aigle, L., Marimoutou, C., Deparis, X., Meynard, J.B., Pradines, B., Simon, F., et al. (2016). Factors associated with malaria chemoprophylaxis compliance among French service members deployed in Central African Republic. *Malar. J.* 15, 1–10.
- Curtis, C.F. (1985). Theoretical models of the use of insecticide mixtures for the management of resistance. *Bull. Entomol. Res.* 75, 259–266.
- D. J. Finney (1971). Probit Analysis. *J. Pharm. Sci.* 60, 1432.
- Dabiré, K.R., Diabaté, A., Djogbenou, L., Ouari, A., N’Guessan, R., Ouédraogo, J.B., Hougard, J.M., Chandre, F., and Baldet, T. (2008). Dynamics of multiple insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in a rice growing area in South-Western Burkina Faso. *Malar. J.* 7, 188.
- Dadzie, S.K., Chabi, J., Asafu-Adjaye, A., Owusu-Akrofi, O., Baffoe-Wilmot, A., Malm, K., Bart-Plange, C., Coleman, S., Appawu, M.A., and Boakye, D.A. (2017). Evaluation of piperonyl butoxide in enhancing the efficacy of pyrethroid insecticides against resistant *Anopheles gambiae* s.l. in Ghana. *Malar. J.* 16, 342.
- Dani, J.A. (2015). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int. Rev. Neurobiol.* 124, 3–19.
- Darriet, F., and Chandre, F. (2011). Combining piperonyl butoxide and dinotefuran restores the efficacy of deltamethrin mosquito nets against resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 48, 952–955.
- Darriet, F., and Chandre, F. (2013). Efficacy of six neonicotinoid insecticides alone and in combination with deltamethrin and piperonyl butoxide against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 69, 905–910.
- 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. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368.
- Davis, E.E., and Sokolove, P.G. (1976). Journal of Comparative Physiology. A Lactic Acid-sensitive Receptors on the Antennae of the Mosquito, *Aedes aegypti*.

- Degennaro, M., McBride, C.S., Seeholzer, L., Nakagawa, T., Dennis, E.J., Goldman, C., Jasinskiene, N., James, A.A., and Vosshall, L.B. (2013). Orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature* 498, 487–491.
- Deletre, E., Schatz, B., Bourguet, D., Chandre, F., Williams, L., Ratnadass, A., and Martin, T. (2016). Prospects for repellent in pest control: current developments and future challenges. *Chemoecology* 26, 127–142.
- Deletre, E., Martin, T., Duménil, C., and Chandre, F. (2019). Insecticide resistance modifies mosquito response to DEET and natural repellents. *Parasites and Vectors* 12, 1–10.
- Dermauw, W., and Van Leeuwen, T. (2014). The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 89–110.
- 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 and Vectors* 12, 1–18.
- 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. *Curr. Opin. Insect Sci.* 30, 52–58.
- Dickens, J.C., and Bohbot, J.D. (2013). Mini review: Mode of action of mosquito repellents. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 149–155.
- Ditzen, M., Pellegrino, M., and Vosshall, L.B. (2008). Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science* (80-. ). 319, 1838–1841.
- Djogbénu, L., Noel, V., and Agnew, P. (2010). Costs of insensitive acetylcholinesterase insecticide resistance for the malaria vector *Anopheles gambiae* homozygous for the G119S mutation. *Malar. J.* 9, 1–8.
- Djouaka, R.F., Bakare, A.A., Coulibaly, O.N., Akogbeto, M.C., Ranson, H., Hemingway, J., and Strode, C. (2008). Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* 9, 538.
- Dolphin, A.C., and Lee, A. (2020). Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 213–229.
- Dong, K. (2007). Insect sodium channels and insecticide resistance. In *Invertebrate Neuroscience*, (NIH Public Access), pp. 17–30.
- Dong, K., Du, Y., Rinkevich, F., Nomura, Y., Xu, P., Wang, L., Silver, K., and Zhorov, B.S. (2014). Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 50, 1–17.
- Du, W., Awolola, T.S., Howell, P., Koekemoer, L.L., Brooke, B.D., Benedict, M.Q., Coetzee, M., and Zheng, L. (2005). Independent mutations in the *Rdl* locus confer dieltrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Mol. Biol.* 14, 179–183.

- Du, Y., Nomura, Y., Zhorov, B., and Dong, K. (2016). Sodium Channel Mutations and Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti*. *Insects* 7, 60.
- Duan, C., Adam, V., Byrdin, M., Ridard, J., Kieffer-Jaquinod, S., Morlot, C., Arcizet, D., Demachy, I., and Bourgeois, D. (2013). Structural Evidence for a Two-Regime Photobleaching Mechanism in a Reversibly Switchable Fluorescent Protein. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 15841–15850.
- Ducrot, V., Askem, C., Azam, D., Brettschneider, D., Brown, R., Charles, S., Coke, M., Collinet, M., Delignette-Muller, M.L., Forfait-Dubuc, C., et al. (2014). Development and validation of an OECD reproductive toxicity test guideline with the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Gastropoda). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 70, 605–614.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L., and Sussman, J.L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* 187, 10–22.
- Edi, C. V., Djogbénou, L., Jenkins, A.M., Regna, K., Muskavitch, M.A.T., Poupardin, R., Jones, C.M., Essandoh, J., Kétoh, G.K., Paine, M.J.I., et al. (2014). CYP6 P450 Enzymes and ACE-1 Duplication Produce Extreme and Multiple Insecticide Resistance in the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet.* 10, e1004236.
- El-Adouzi, M., Apaire-Marchais, V., Raymond, V., and Lapied, B. (2020). New insecticide composition.
- Elanga-Ndille, E., Nouage, L., Ndo, C., Binyang, A., Assatse, T., Nguiffo-Nguete, D., Djonabaye, D., Irwing, H., Tene-Fossog, B., and Wondji, C.S. (2019). The G119S Acetylcholinesterase (Ace-1) Target Site Mutation Confers Carbamate Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles gambiae* from Cameroon: A Challenge for the Coming IRS Implementation. *Genes (Basel).* 10, 1–14.
- Eleftherianos, I., Foster, S.P., Williamson, M.S., and Denholm, I. (2008). Inheritance of L1014F and M918T sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance in *Myzus persicae*. *Biol. Lett.* 4, 545–548.
- Elliott, M., Farnham, A.W., Janes, N.F., Needham, P.H., Pulman, D.A., and Stevenson, J.H. (1973). A photostable pyrethroid. *Nature* 246, 169–170.
- Eneh, L.K. (2016). Oviposition cues as a tool for developing a new malaria control strategy.
- Fagbohun, I.K., Idowu, E.T., Otubanjo, O.A., and Awolola, T.S. (2020). First report of AChE1 (G119S) mutation and multiple resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* s.s. in Nigeria. *Sci. Rep.* 10, 1–9.
- Fall, B., Pascual, A., Sarr, F.D., Wurtz, N., Richard, V., Baret, E., Diémé, Y., Briolant, S., Bercion, R., Wade, B., et al. (2013). *Plasmodium falciparum* susceptibility to anti-malarial drugs in Dakar, Senegal, in 2010: An ex vivo and drug resistance molecular markers study. *Malar. J.* 12, 107.
- Fankhauser, B., Dumont, P., Hunter, J.S., McCall, J.W., Kaufmann, C., Mathis, A., Young, D.R., Carroll, S.P., McCall, S., Chester, S.T., et al. (2015). Repellent and insecticidal efficacy of a new combination of fipronil and permethrin against three mosquito species ( *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* ) on dogs. *Parasites Vectors* 2015 81 8, 1–8.

- Farenhorst, M., Knols, B.G.J., Thomas, M.B., Howard, A.F.V., Takken, W., Rowland, M., and N'Guessan, R. (2010). Synergy in efficacy of fungal entomopathogens and permethrin against west african insecticide-resistant *Anopheles gambiae* mosquitoes. *PLoS One* 5, e12081.
- Faulde, M.K., and Nehring, O. (2012). Synergistic insecticidal and repellent effects of combined pyrethroid and repellent-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating multi-layer technique. *Parasitol. Res.* 2012 1112 *111*, 755–765.
- Faulde, M.K., Albiez, G., and Nehring, O. (2010). Insecticidal, acaricidal and repellent effects of DEET-and IR3535-impregnated bed nets using a novel long-lasting polymer-coating technique. *Parasitol. Res.* 106, 957–965.
- Feng, G., Deak, P., Chopra, M., and Hall, L.M. (1995). Cloning and functional analysis of tipE, a novel membrane protein that enhances *Drosophila para* sodium channel function. *Cell* 82, 1001–1011.
- Feyereisen, R. (2005). Insect Cytochrome P450. *Compr. Mol. Insect Sci.* 4–6, 1–77.
- 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. *Eur. Biophys. J.* 46, 675–679.
- Fischer, J., Müller, T., Spatz, A.K., Greggers, U., Grünewald, B., and Menzel, R. (2014). Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *PLoS One* 9.
- Fongnikin, A., Houeto, N., Agbevo, A., Odjo, A., Syme, T., N'Guessan, R., and Ngufor, C. (2020). Efficacy of Fludora® Fusion (a mixture of deltamethrin and clothianidin) for indoor residual spraying against pyrethroid-resistant malaria vectors: Laboratory and experimental hut evaluation. *Parasites and Vectors* 13, 466.
- Fornadel, C.M., Norris, L.C., Glass, G.E., and Norris, D.E. (2010). Analysis of *Anopheles arabiensis* blood feeding behavior in southern zambia during the two years after introduction of insecticide-treated bed nets. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 83, 848–853.
- Foster, W.A. (1995). Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu. Rev. Entomol.* 40, 443–474.
- Foster, S.P., Paul, V.L., Slater, R., Warren, A., Denholm, I., Field, L.M., and Williamson, M.S. (2014). A mutation (L1014F) in the voltage-gated sodium channel of the grain aphid, *Sitobion avenae*, is associated with resistance to pyrethroid insecticides. *Pest Manag. Sci.* 70, 1249–1253.
- Fouet, C., Ashu, A.F., Ambadiang, M.M., Tchapgá, W., Wondji, C.S., and Kamdem, C. (2020). Resistance of *Anopheles gambiae* to the new insecticide clothianidin associated with unrestricted use of agricultural neonicotinoids in Yaoundé, Cameroon. *BioRxiv* 2020.08.06.239509.
- Franc, M., Genchi, C., Bouhsira, E., Warin, S., Kaltsatos, V., Baduel, L., and Genchi, M. (2012). Efficacy of dinotefuran, permethrin and pyriproxyfen combination spot-on against *Aedes aegypti* mosquitoes on dogs. *Vet. Parasitol.* 189, 333–337.



- Frenz, C.T., Hansen, A., Dupuis, N.D., Shultz, N., Levinson, S.R., Finger, T.E., and Dionne, V.E. (2014). NaV1.5 sodium channel window currents contribute to spontaneous firing in olfactory sensory neurons. *J. Neurophysiol.* *112*, 1091.
- Frolov, R., Immonen, E.V., and Weckström, M. (2016). Visual ecology and potassium conductances of insect photoreceptors. *J. Neurophysiol.* *115*, 2147–2157.
- Garrett-Jones, C. (1964). The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull. World Health Organ.* *30*, 241–261.
- Gary, R.E., and Foster, W.A. (2004). *Anopheles gambiae* feeding and survival on honeydew and extra-floral nectar of peridomestic plants. *Med. Vet. Entomol.* *18*, 102–107.
- Gatton, M.L., Chitnis, N., Churcher, T., Donnelly, M.J., Ghani, A.C., Godfray, H.C.J., Gould, F., Hastings, I., Marshall, J., Ranson, H., et al. (2013). The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution (N. Y.)*. *67*, 1218–1230.
- Gentet, L.J., Stuart, G.J., and Clements, J.D. (2000). Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophys. J.* *79*, 314–320.
- Ghaninia, M., Hansson, B.S., and Ignell, R. (2007). The antennal lobe of the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae* - innervation and three-dimensional reconstruction. *Arthropod Struct. Dev.* *36*, 23–39.
- Gharpure, A., Noviello, C.M., and Hibbs, R.E. (2020). Progress in nicotinic receptor structural biology. *Neuropharmacology* *171*, 108086.
- Ghazanfari, N., Mueller, S.N., and Heath, W.R. (2018). Cerebral Malaria in Mouse and Man. *Front. Immunol.* *0*, 2016.
- Giniatullin, R., Nistri, A., and Yakel, J.L. (2005). Desensitization of nicotinic ACh receptors: Shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci.* *28*, 371–378.
- Goulson, D. (2018). Call to restrict neonicotinoids. *Science (80-. )*. *360*, 973.
- Goulu, M. (2015). Développement d'une nouvelle stratégie de protection chimique contre les moustiques vecteurs de maladies : utilisation d'une association répulsif/insecticide afin d'optimiser l'efficacité du traitement tout en réduisant les doses utilisées.
- Grienberger, C., and Konnerth, A. (2012). Imaging Calcium in Neurons. *Neuron* *73*, 862–885.
- Grigoraki, L., Puggioli, A., Mavridis, K., Douris, V., Montanari, M., Bellini, R., and Vontas, J. (2017). Striking diflubenzuron resistance in *Culex pipiens*, the prime vector of West Nile Virus. *Sci. Reports* 2017 71 7, 1–8.
- Grolleau, F., and Lapied, B. (2000). Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J Exp.Biol.* *203 Pt 11*, 1633–1648.
- Grünewald, B., and Siefert, P. (2019). Acetylcholine and Its Receptors in Honeybees: Involvement in Development and Impairments by Neonicotinoids. *Insects* *10*.

- Haghighi, A.P., and Cooper, E. (1998). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors are blocked by intracellular spermine in a voltage-dependent manner. *J. Neurosci.* *18*, 4050–4062.
- Haghighi, A.P., and Cooper, E. (2000). A Molecular Link between Inward Rectification and Calcium Permeability of Neuronal Nicotinic Acetylcholine  $\alpha 3\beta 4$  and  $\alpha 4\beta 2$  Receptors. *J. Neurosci.* *20*, 529.
- Hamid-Adiamoh, M., Amambua-Ngwa, A., Nwakanma, D., D'Alessandro, U., Awandare, G.A., and Afrane, Y.A. (2020). Insecticide resistance in indoor and outdoor-resting *Anopheles gambiae* in Northern Ghana. *Malar. J.* 2020 *19*, 1–12.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* *391*, 85–100.
- Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., Gribble, M., Baker, D., Marois, E., Russell, S., et al. (2016). A CRISPR-Cas9 gene drive system targeting female reproduction in the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nat. Biotechnol.* *34*, 78–83.
- Han, E.H., Kim, H.G., Im, J.H., Jeong, T.C., and Jeong, H.G. (2009). Up-regulation of CYP1A1 by rutaecarpine is dependent on aryl hydrocarbon receptor and calcium. *Toxicology* *266*, 38–47.
- Harbach, R.E. (2013). The Phylogeny and Classification of *Anopheles*.
- Hardy, A., Ettrich, G., Cross, D.E., Bunting, P., Liywalii, F., Sakala, J., Silumesii, A., Singini, D., Smith, M., Willis, T., et al. (2019). Automatic detection of open and vegetated water bodies using Sentinel 1 to map African malaria vector mosquito breeding habitats. *Remote Sens.* *11*, 593.
- He, R., Zhang, J., Yu, Y., Jizi, L., Wang, W., and Li, M. (2018). New Insights Into Interactions of Presynaptic Calcium Channel Subtypes and SNARE Proteins in Neurotransmitter Release. *Front. Mol. Neurosci.* *11*, 213.
- Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., and Ranson, H. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* *34*, 653–665.
- Henry, M., Béguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S., and Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* (80-. ). *336*, 348–350.
- Hernández-Balaguera, E., Vara, H., and Polo, J.L. (2018). Identification of Capacitance Distribution in Neuronal Membranes from a Fractional-Order Electrical Circuit and Whole-Cell Patch-Clamped Cells. *J. Electrochem. Soc.* *165*, G3104–G3111.
- Hernandez, C.M., and Richards, J.R. (2019). *Physiology, Sodium Channels* (StatPearls Publishing).
- Hill, C.A., Fox, A.N., Pitts, R.J., Kent, L.B., Tan, P.L., Chrystal, M.A., Cravchik, A., Collins, F.H., Robertson, H.M., and Zwiebel, L.J. (2002). G protein-coupled receptors in *Anopheles gambiae*. *Science* (80-. ). *298*, 176–178.

- Hirokawa, N., Niwa, S., and Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68, 610–638.
- Ho-Pun-Cheung, A., Bascoul-Mollevi, C., Assenat, E., Boissière-Michot, F., Bibeau, F., Cellier, D., Ychou, M., and Lopez-Crapez, E. (2009). Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction: description of a RIN-based algorithm for accurate data normalization. *BMC Mol. Biol.* 10, 31.
- Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., Sutton, G.G., Charlab, R., Nusskern, D.R., Wincker, P., Clark, A.G., Ribeiro, J.C., Wides, R., et al. (2002a). The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* (80-. ). 298, 129–149.
- Holt, R.A., Mani Subramanian, G., Halpern, A., Sutton, G.G., Charlab, R., Nusskern, D.R., Wincker, P., Clark, A.G., Ribeiro, J.M.C., Wides, R., et al. (2002b). The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* (80-. ). 298, 129–149.
- Holyoke, C.W., Zhang, W., Pahutski, T.F., Lahm, G.P., Tong, M.H.T., Cordova, D., Schroeder, M.E., Benner, E.A., Rauh, J.J., Dietrich, R.F., et al. (2015). Triflumezopyrim: Discovery and optimization of a mesoionic insecticide for rice. In *ACS Symposium Series*, (American Chemical Society), pp. 365–378.
- Holyoke, C.W., Cordova, D., Zhang, W., Barry, J.D., Leighty, R.M., Dietrich, R.F., Rauh, J.J., Pahutski, T.F., Lahm, G.P., Tong, M.-H.T., et al. (2017). Mesoionic insecticides: a novel class of insecticides that modulate nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Manag. Sci.* 73, 796–806.
- Ihara, M., Buckingham, S.D., Matsuda, K., and Sattelle, D.B. (2017). Modes of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr. Med. Chem.* 24.
- Ingham, V.A., Pignatelli, P., Moore, J.D., Wagstaff, S., and Ranson, H. (2017). The transcription factor Maf-S regulates metabolic resistance to insecticides in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* 18, 1–11.
- Ingham, V.A., Wagstaff, S., and Ranson, H. (2018). Transcriptomic meta-signatures identified in *Anopheles gambiae* populations reveal previously undetected insecticide resistance mechanisms. *Nat. Commun.* 9.
- 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, 376–380.
- Inoue, S., Murata, K., Tanaka, A., Kakuta, E., Tanemura, S., Hatakeyama, S., Nakamura, A., Yamamoto, C., Hasebe, M., Kosakai, K., et al. (2014). Ionic channel mechanisms mediating the intrinsic excitability of Kenyon cells in the mushroom body of the cricket brain. *J. Insect Physiol.* 68, 44–57.
- IRAC (2015). IRAC MoA Classification for Mosquito Vectors of Disease. 1–9.

- Isaacs, A.T., Mawejje, H.D., Tomlinson, S., Rigden, D.J., and Donnelly, M.J. (2018). Genome-wide transcriptional analyses in *Anopheles* mosquitoes reveal an unexpected association between salivary gland gene expression and insecticide resistance. *BMC Genomics* 19, 225.
- Jones, a K., and Sattelle, D.B. (2010). Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Adv. Exp. Med. Biol.* 683, 25–43.
- Jones, A.K., Grauso, M., and Sattelle, D.B. (2005). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* 85, 176–187.
- 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 Manag. Sci.* 77, 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6614–6619.
- Kabbale, F.G., Akol, A.M., Kaddu, J.B., and Onapa, A.W. (2013). Biting patterns and seasonality of *Anopheles gambiae sensu lato* and *Anopheles funestus* mosquitoes in Kamuli District, Uganda. *Parasites and Vectors* 6, 340.
- Kamareddine, L. (2012). The biological control of the malaria vector. *Toxins (Basel)*. 4, 748–767.
- Kawada, H., Ohashi, K., Dida, G.O., Sonye, G., Njenga, S.M., Mwandawiro, C., and Minakawa, N. (2014). Insecticidal and repellent activities of pyrethroids to the three major pyrethroid-resistant malaria vectors in western Kenya. *Parasites Vectors* 2014 71 7, 1–9.
- Keil, T.A. (1997). Comparative morphogenesis of sensilla: A review. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 26, 151–160.
- Kelly, A.H., Koudakossi, H.N.B., and Moore, S.J. (2017). Repellents and New “Spaces of Concern” in Global Health. *Med. Anthropol. Cross Cult. Stud. Heal. Illn.* 36, 464–478.
- Kessler, S., Vlimant, M., and Guerin, P.M. (2013). The sugar meal of the african malaria mosquito *Anopheles gambiae* and how deterrent compounds interfere with it: A behavioural and neurophysiological study. *J. Exp. Biol.* 216, 1292–1306.
- Kessler, S., Vlimant, M., and Guerin, P.M. (2015). Sugar-sensitive neurone responses and sugar feeding preferences influence lifespan and biting behaviours of the Afrotropical malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 201, 317–329.
- Kleinschmidt, I., Bradley, J., Knox, T.B., Mnzava, A.P., Kafy, H.T., Mbogo, C., Ismail, B.A., Bigoga, J.D., Adechoubou, A., Raghavendra, K., et al. (2018). Implications of insecticide resistance for malaria vector control with long-lasting insecticidal nets: a WHO-coordinated, prospective, international, observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 18, 640–649.
- Koganemaru, R., Miller, D.M., and Adelman, Z.N. (2013). Robust cuticular penetration resistance in the common bed bug (*Cimex lectularius* L.) correlates with increased steady-state transcript levels of CPR-type cuticle protein genes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 106, 190–197.

- Kongmee, M., Thanispong, K., Sathantriphop, S., Sukkanon, C., Bangs, M.J., and Chareonviriyaphap, T. (2019). Enhanced mortality in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* in Thailand using a piperonyl butoxide synergist. *Acta Trop.* 189, 76–83.
- Kornreich, B.G. (2007). The patch clamp technique: Principles and technical considerations. *J. Vet. Cardiol.* 9, 25–37.
- Kuthiala, A., Gupta, R.K., and Davis, E.E. (1992). Effect of the repellent deet on the antennal chemoreceptors for oviposition in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 29, 639–643.
- Kweka, E., Mazigo, H., Mapunda, G., and Yewhalaw, D. (2017). Piperonyl Butoxide: An Enhancing Arsenal for an Adomant Foe. *J. Transm. Dis. Immun.* 01, 15–16.
- Kwiatkowska, R.M., Platt, N., Poupardin, R., Irving, H., Dabire, R.K., Mitchell, S., Jones, C.M., Diabaté, A., Ranson, H., and Wondji, C.S. (2013). Dissecting the mechanisms responsible for the multiple insecticide resistance phenotype in *Anopheles gambiae* s.s., M form, from Vallée du Kou, Burkina Faso.
- Kwon, H.-W., Lu, T., Rützler, M., and Zwiebel, L.J. (2006). Olfactory responses in a gustatory organ of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13526.
- Lansdell, S.J., Collins, T., Yabe, A., Gee, V.J., Gibb, A.J., and Millar, N.S. (2008). Host-cell specific effects of the nicotinic acetylcholine receptor chaperone RIC-3 revealed by a comparison of human and *Drosophila* RIC-3 homologues. *J. Neurochem.* 105, 1573–1581.
- Lapied, B., Malécot, C.O., and Pelhate, M. (1989). Ionic Species Involved in the Electrical Activity of Single Adult Aminergic Neurons Isolated from the Sixth Abdominal Ganglion of the Cockroach *Periplaneta Americana*. *J. Exp. Biol.* 144, 535–549.
- Lapied, B., Pannetier, C., Apaire-Marchais, V., Licznar, P., and Corbel, V. (2009). Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends Biotechnol.* 27, 190–198.
- 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? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333, 264–272.
- Lavialle-Defaix, C., Apaire-Marchais, V., Legros, C., Pannetier, 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. *J. Neurosci. Methods* 200, 68–73.
- Lavialle-Defaix, C., Jacob, V., Monsempès, C., Anton, S., Rospars, J.P., Martinez, D., and Lucas, P. (2015). Firing and intrinsic properties of antennal lobe neurons in the Noctuid moth *Agrotis ipsilon*. *Biosystems* 136, 46–58.
- Leal, W.S. (2014). The enigmatic reception of DEET - The gold standard of insect repellents. *Curr. Opin. Insect Sci.* 6, 93–98.

- Lee, A.M., Wu, D.F., Dadgar, J., Wang, D., McMahon, T., and Messing, R.O. (2015). PKC $\epsilon$  phosphorylates  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic ACh receptors and promotes recovery from desensitization. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 4430–4441.
- Lee, Y., Kim, S.H., and Montell, C. (2010). Avoiding DEET through insect gustatory receptors. *Neuron* *67*, 555.
- Lees, R., Praulins, G., Davies, R., Brown, F., Parsons, G., White, A., Ranson, H., Small, G., and Malone, D. (2019). A testing cascade to identify repurposed insecticides for next-generation vector control tools: screening a panel of chemistries with novel modes of action against a malaria vector. *Gates Open Res.* *3*, 1464.
- Lees, R.S., Gilles, J.R., Hendrichs, J., Vreysen, M.J., and Bourtzis, K. (2015). Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. *Curr. Opin. Insect Sci.* *10*, 156–162.
- 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.
- Li, T., Zhang, L., Reid, W.R., Xu, Q., Dong, K., and Liu, N. (2012). Multiple mutations and mutation combinations in the sodium channel of permethrin resistant mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *Sci. Reports* *2012* *21* *2*, 1–9.
- Liao, X., Xu, P.-F., Gong, P.-P., Wan, H., and Li, J.-H. (2021). Current susceptibilities of brown planthopper *Nilaparvata lugens* to triflumezopyrim and other frequently used insecticides in China. *Insect Sci.* *28*, 115–126.
- 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. *J. Virol. Methods* *195*, 72–75.
- Lin, Y., Jin, T., Zeng, L., and Lu, Y. (2012). Cuticular penetration of  $\beta$ -cypermethrin in insecticide-susceptible and resistant strains of *Bactrocera dorsalis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* *103*, 189–193.
- 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. *J. Neurochem.* *130*, 507–513.
- Liu, N. (2015). Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annu. Rev. Entomol.* *60*, 537–559.
- Loesel, R., Weigel, S., and Bräunig, P. (2006). A simple fluorescent double staining method for distinguishing neuronal from non-neuronal cells in the insect central nervous system. *J. Neurosci. Methods* *155*, 202–206.
- Lol, J.C., Castellanos, M.E., Liebman, K.A., Lenhart, A., Pennington, P.M., and Padilla, N.R. (2013). Molecular evidence for historical presence of knock-down resistance in *Anopheles albimanus*, a key malaria vector in Latin America. *Parasites and Vectors* *6*.

- Lu, T., Qiu, Y.T., Wang, G., Kwon, J.Y., Rutzler, M., Kwon, H.W., Pitts, R.J., van Loon, J.J.A., Takken, W., Carlson, J.R., et al. (2007). Odor Coding in the Maxillary Palp of the Malaria Vector Mosquito *Anopheles gambiae*. *Curr. Biol.* *17*, 1533–1544.
- Lü, S., 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). *Front. Physiol.* *0*, 400.
- Lupi, E., Hatz, C., and Schlagenhauf, P. (2013). The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. - A literature review. *Travel Med. Infect. Dis.* *11*, 374–411.
- Machani, M.G., Ochomo, E., Zhong, D., Zhou, G., Wang, X., Githeko, A.K., Yan, G., and Afrane, Y.A. (2020). Phenotypic, genotypic and biochemical changes during pyrethroid resistance selection in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Sci. Rep.* *10*, 1–8.
- Maia, M.F., Kliner, M., Richardson, M., Lengeler, C., and Moore, S.J. (2018). Mosquito repellents for malaria prevention. *Cochrane Database Syst. Rev.* *2018*.
- Mannai, S., Bitri, L., and Thany, S.H. (2016). cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway modulates nicotine-induced currents through the activation of  $\alpha$ -bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptors from insect neurosecretory cells. *J. Neurochem.* *137*, 931–938.
- Manuel Technique BASF, C.P.D. (2013). Insecticide Mode of Action.
- Mapossa, A.B., Focke, W.W., Tewo, R.K., Androsch, R., and Kruger, T. (2021). Mosquito-repellent controlled-release formulations for fighting infectious diseases. *Malar. J.* *20*, 165.
- Marban, E., Yamagishi, T., and Tomaselli, G.F. (1998). Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J. Physiol.* *508*, 647–657.
- Marimo, P., Hayeshi, R., and Mukanganyama, S. (2016). Inactivation of *Anopheles gambiae* Glutathione Transferase  $\epsilon 2$  by Epiphylloucoumarin. *Biochem. Res. Int.* *2016*.
- 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 Mol. Biol.* *7*, 179–184.
- Matambo, T.S., Abdalla, H., Brooke, B.D., Koekemoer, L.L., Mnzava, A., Hunt, R.H., and Coetzee, M. (2007). Insecticide resistance in the malarial mosquito *Anopheles arabiensis* and association with the kdr mutation. *Med. Vet. Entomol.* *21*, 97–102.
- Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M., and Sattelle, D.B. (2001). Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* *22*, 573–580.
- Matsuda, K., Ihara, M., and Sattelle, D.B. (2020). Neonicotinoid Insecticides: Molecular Targets, Resistance, and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *60*, 241–255.

- Mavridis, K., Wipf, N., Medves, S., Erquiaga, I., Müller, P., and Vontas, J. (2019). Rapid multiplex gene expression assays for monitoring metabolic resistance in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biological Sciences* 0604 Genetics. *Parasites and Vectors* 12.
- Melander, A.L. (1914). Can Insects Become Resistant to Sprays? *J. Econ. Entomol.* 7, 167–173.
- Melo, A.C.A., Rützler, M., Pitts, R.J., and Zwiebel, L.J. (2004). Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. *Chem. Senses* 29, 403–410.
- Migliani, R., Ollivier, L., Romand, O., Verret, C., R, H.C., Todesco, A., Pages, F., Pradines, B., Queyriaux, B., Texier, G., et al. (2008). Paludisme chez les militaires français en Côte d'Ivoire de 1998 à 2006. Numéro thématique. Santé des voyageurs et des expatriés. *Bull Epidemiol Hebd* 064, 209–212.
- Migliani, R., Pradines, B., Michel, R., Aoun, O., Dia, A., Deparis, X., and Rapp, C. (2014). Malaria control strategies in French armed forces. *Travel Med. Infect. Dis.* 12, 307–317.
- Milesi P., Pocquet N. & Labbé P. BioRssay: a R script for bioassay analyses. <https://drive.google.com/file/d/1qMNC2EQlxBnOounuaauta1BCQcLesnrFX/view>
- Moignot, B., Lemaire, C., Quinchard, S., Lapied, B., and Legros, C. (2009). The discovery of a novel sodium channel in the cockroach *Periplaneta americana*: Evidence for an early duplication of the para-like gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 814–823.
- Moiroux, N., Damien, G.B., Egrot, M., Djenontin, A., Chandre, F., Corbel, V., Killeen, G.F., and Penetier, C. (2014). Human exposure to early morning *Anopheles funestus* biting behavior and personal protection provided by long-lasting insecticidal nets. *PLoS One* 9.
- Mongin, E., Louis, C., Holt, R.A., Birney, E., and Collins, F.H. (2004). The *Anopheles gambiae* genome: An update. *Trends Parasitol.* 20, 49–52.
- Morales-Perez, C.L., Noviello, C.M., and Hibbs, R.E. (2016). X-ray structure of the human  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor. *Nature* 538, 411–415.
- Moreau, E., Mikulska-Ruminska, K., Goulu, M., Perrier, S., Deshayes, C., Stankiewicz, M., Afaire-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. *Sci. Rep.* 10, 1–15.
- Moyes, C.L., Lees, R.S., Yunta, C., Walker, K.J., Hemmings, K., Oladepo, F., Hancock, P.A., Weetman, D., Paine, M.J.I., and Ismail, H.M. (2021). Assessing cross-resistance within the pyrethroids in terms of their interactions with key cytochrome P450 enzymes and resistance in vector populations. *Parasites Vectors* 2021 141 14, 1–13.
- Mulatier, and Margaux (2018). Interaction entre l'état physiologique du moustique et le mode d'action des répulsifs chez les vecteurs de pathogènes.



- Mulatier, M., Ahoua Alou, L.P., Chandre, F., Penetier, C., Dormont, L., and Cohuet, A. (2018a). Effect of DEET-multiple exposures on behavior and life history traits in the malaria mosquito *Anopheles gambiae* (s.s.). *Parasites and Vectors* 11.
- Mulatier, M., Porciani, A., Nadalin, L., Phamien, L., Alou, A., Chandre, F., Penetier, C., Dormont, L., and Cohuet, A. (2018b). DEET Efficacy Increases With Age in the Vector Mosquitoes *Anopheles gambiae* s.s. and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 55, 1542–1548.
- Mulatier, M., Camara, S., Koffi, A., Carrasco, D., Porciani, A., Chandre, F., Moiroux, N., Lefevre, T., Dabiré, R., Assi, S., et al. (2019). Efficacy of vector control tools against malaria-infected mosquitoes. *Sci. Rep.* 9, 6664.
- Mushinzimana, E., Munga, S., Minakawa, N., Li, L., Feng, C., Bian, L., Kitron, U., Schmidt, C., Beck, L., Zhou, G., et al. (2006). Landscape determinants and remote sensing of anopheline mosquito larval habitats in the western Kenya highlands. *Malar. J.* 2006 51 5, 1–11.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., and Schmuck, R. (2001). Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag. Sci.* 57, 577–586.
- Nauen, R., Zimmer, C.T., and Vontas, J. (2021). Heterologous expression of insect P450 enzymes that metabolize xenobiotics. *Curr. Opin. Insect Sci.* 43, 78–84.
- Nolan, T. (2021). Control of malaria-transmitting mosquitoes using gene drives. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 376, 20190803.
- OECD 211 (2012). OECD Guideline for the Testing of Chemicals, *Daphnia magna* Reproduction Test 211. Organ. Econ. Co-Operation Dev. Paris, Fr. October, 1–21.
- Ohm, J.R., Baldini, F., Barreaux, P., Lefevre, T., Lynch, P.A., Suh, E., Whitehead, S.A., and Thomas, M.B. (2018). Rethinking the extrinsic incubation period of malaria parasites. *Parasites and Vectors* 11, 178.
- OMS (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. World Heal. Organ. 1–41.
- OMS (2006). Malaria Vector Control. WHO Technical Report Series 936. Report of a WHO Study Group.
- OMS (2016a). Global report on insecticide resistance in malaria vectors: 2010-2016 Global Malaria Programme.
- OMS (2016b). Test procedures for insecticide resistance - Technical Update 2016. World Heal. Organ. 55 p.
- OMS (2018a). Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme Seconde édition. 55.
- OMS (2018b). Situation et tendances de la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme (2018).

OMS (2019). World malaria report 2019.

OMS (2020). World malaria report 2020.

Opiyo, M.A., Ngowo, H.S., Mapua, S.A., Mpingwa, M., Nchimbi, N., Matowo, N.S., Majambere, S., and Okumu, F.O. (2021). Sub-lethal aquatic doses of pyriproxyfen may increase pyrethroid resistance in malaria mosquitoes. *PLoS One* 16, e0248538.

Oumbouke, W.A., Pignatelli, P., Barreaux, A.M.G., Tia, I.Z., Koffi, A.A., Ahoua Alou, L.P., Sternberg, E.D., Thomas, M.B., Weetman, D., and N'Guessan, R. (2020). Fine scale spatial investigation of multiple insecticide resistance and underlying target-site and metabolic mechanisms in *Anopheles gambiae* in central Côte d'Ivoire. *Sci. Rep.* 10, 1–13.

Oxborough, R.M., Seyoum, A., Yihdego, Y., Dabire, R., Gnanguenon, V., Wat'Senga, F., Agossa, F.R., Yohannes, G., Coleman, S., Samdi, L.M., et al. (2019). Susceptibility testing of *Anopheles malaria* vectors with the neonicotinoid insecticide clothianidin; Results from 16 African countries, in preparation for indoor residual spraying with new insecticide formulations. *Malar. J.* 18.

Pages, F. (2009). La lutte antivectorielle dans les armées: une nécessité historique, une adaptation indispensable. Undefined.

Paluch, G., Bartholomay, L., and Coats, J. (2010). Mosquito repellents: a review of chemical structure diversity and olfaction. *Pest Manag. Sci.* 66, 925–935.

Pang, Y.-P. (2006). Novel Acetylcholinesterase Target Site for Malaria Mosquito Control. *PLoS One* 1, 58.

Pang, Y.-P., Brimijoin, S., W. Ragsdale, D., Yan Zhu, K., and Suranyi, R. (2012). Novel and Viable Acetylcholinesterase Target Site for Developing Effective and Environmentally Safe Insecticides. *Curr. Drug Targets* 13, 471–482.

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

Pennetier, C., Corbel, V., and Hougard, J.M. (2005). Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: A new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 739–744.

Pennetier, C., Corbel, V., Boko, P., Odjo, A., N'Guessan, R., Lapied, B., and Hougard, J.M. (2007). Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malar. J.* 6.

Pennetier, C., Costantini, C., Corbel, V., Licciardi, S., Dabiré, R.K., Lapied, B., Chandre, F., and Hougard, J.-M. (2009). Synergy between Repellents and Organophosphates on Bed Nets: Efficacy and Behavioural Response of Natural Free-Flying *An. gambiae* Mosquitoes. *PLoS One* 4.

Perrier, S., Moreau, E., Deshayes, C., El-Adouzi, M., Goven, D., Chandre, F., and Lapied, B. (2021). Compensatory mechanisms in resistant *Anopheles gambiae* *AcerKis* and *KdrKis* neurons modulate insecticide-based mosquito control. *Commun. Biol.* 4.

- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 45e – 45.
- 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 Mol. Biol.* 27, 110–122.
- 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. *Pestic. Biochem. Physiol.* 157, 1–12.
- Pitts, R.J., Fox, A.N., and Zwiebeil, L.J. (2004). A highly conserved candidate chemoreceptor expressed in both olfactory and gustatory tissues in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 5058–5063.
- Pradines, B., Hovette, P., Fusai, T., Atanda, H.L., Baret, E., Cheval, P., Mosnier, J., Callec, A., Cren, J., Amalvict, R., et al. (2006). Prevalence of in vitro resistance to eleven standard or new antimalarial drugs among *Plasmodium falciparum* isolates from Pointe-Noire, Republic of the Congo. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2404–2408.
- Prakriya, M. (2020). Calcium and cell function. *J. Physiol.* 598, 1647–1648.
- Pridgeon, J.W., Bernier, U.R., and Becnel, J.J. (2009). Toxicity Comparison Of Eight Repellents Against Four Species Of Female Mosquitoes.
- Pwalia, R., Joannides, J., Iddrisu, A., Addae, C., Acquah-Baidoo, D., Obuobi, D., Amlalo, G., Akporh, S., Gbagba, S., Dadzie, S.K., et al. (2019). High insecticide resistance intensity of *Anopheles gambiae* ( s.l. ) and low efficacy of pyrethroid LLINs in Accra, Ghana. *Parasites Vectors* 2019 121 12, 1–9.
- Qiu, Y.T., Smallegange, R.C., Van Loon, J.J.A., and Takken, W. (2011). Behavioural responses of *Anopheles gambiae* sensu stricto to components of human breath, sweat and urine depend on mixture composition and concentration. *Med. Vet. Entomol.* 25, 247–255.
- Quick, M.W., and Lester, R.A.J. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J. Neurobiol.* 53, 457–478.
- Radi, Z., and Taylor, P. (2006). Structure and Function of Cholinesterases.
- Ranson, H. (2017). Current and future prospects for preventing malaria transmission via the use of insecticides. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7.
- Ranson, H., and Lissenden, N. (2016). Insecticide Resistance in African *Anopheles* Mosquitoes: A Worsening Situation that Needs Urgent Action to Maintain Malaria Control. *Trends Parasitol.* 32, 187–196.
- Raymond, V., Goven, D., Benzidane, Y., List, O., and Lapied, B. (2017). Influence of Cellular and Molecular Factors on Membrane Target Sensitivity to Insecticides. *Curr. Med. Chem.* 24, 2974–2987.

- Reddy, M.R., Overgaard, H.J., Abaga, S., Reddy, V.P., Caccone, A., Kiszewski, A.E., and Slotman, M.A. (2011). Outdoor host seeking behaviour of *Anopheles gambiae* mosquitoes following initiation of malaria vector control on Bioko Island, Equatorial Guinea. *Malar. J.* 10, 184.
- Riabinina, O., Task, D., Marr, E., Lin, C.C., Alford, R., O'Brochta, D.A., and Potter, C.J. (2016). Organization of olfactory centres in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nat. Commun.* 7, 1–12.
- Rivero, A., Vézilier, J., Weill, M., Read, A.F., and Gandon, S. (2010). Insecticide control of vector-borne diseases: When is insecticide resistance a problem? *PLoS Pathog.* 6, 5–6.
- Roush, R.T. (1993). Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitol. Today* 9, 174–179.
- Rubaiy, H.N. (2017). A short guide to electrophysiology and ion channels. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 20, 48–67.
- Rush, A.M., Bräu, M.E., Elliott, A.A., and Elliott, J.R. (1998). Electrophysiological properties of sodium current subtypes in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J. Physiol.* 511, 771.
- Russell, T.L., Govella, N.J., Azizi, S., Drakeley, C.J., Kachur, S.P., and Killeen, G.F. (2011). Increased proportions of outdoor feeding among residual malaria vector populations following increased use of insecticide-treated nets in rural Tanzania. *Malar. J.* 10, 80.
- Ryglewski, S., Pflueger, H.J., and Duch, C. (2007). Expanding the neuron's calcium signaling repertoire: Intracellular calcium release via voltage-induced PLC and IP3R activation. *PLoS Biol.* 5, 818–827.
- Sanei Dehkordi, A., Salim Abadi, Y., Nasirian, H., Hazratian, T., Gorouhi, M.A., Yousefi, S., and Paksa, A. (2017). Synergists action of piperonyl butoxide and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate on toxicity of carbamate insecticides against *Blattella germanica*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, 981–986.
- Sanford, J.L., Shields, V.D.C., and Dickens, J.C. (2013). Gustatory receptor neuron responds to DEET and other insect repellents in the yellow-fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Naturwissenschaften* 100, 269–273.
- Santi-Vuillemin, L. (2018). Connaissances , attitudes et pratiques des militaires de l ' armée de terre sur les principaux risques infectieux en opérations extérieures HAL Id : hal-01931836.
- Sato, K., Pellegrino, M., Nakagawa, T., Nakagawa, T., Vosshall, L.B., and Touhara, K. (2008). Insect olfactory receptors are heteromeric ligand-gated ion channels. *Nature* 452, 1002–1006.
- Sattelle, D.B., Cordova, D., and Cheek, T.R. (2008). Insect ryanodine receptors: Molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebr. Neurosci.* 8, 107–119.
- Sauvet, F., Lebeau, C., Foucher, S., Flusain, O., Jouanin, J.C., and Debonne, J.M. (2009). Operational impact of health problems observed during a four-month military deployment in Ivory Coast. *Mil. Med.* 174, 921–928.

- Schmidt, H.R., and Benton, R. (2020). Molecular mechanisms of olfactory detection in insects: beyond receptors. *Open Biol.* 10, 200252.
- Schoepke, A., Steffen, R., and Gratz, N. (1998). Effectiveness of Personal Protection Measures against Mosquito Bites for Malaria Prophylaxis in Travelers. *J. Travel Med.* 5, 188–192.
- Seixas, G., Grigoraki, L., Weetman, D., Vicente, J.L., Silva, A.C., Pinto, J., Vontas, J., and Sousa, C.A. (2017). Insecticide resistance is mediated by multiple mechanisms in recently introduced *Aedes aegypti* from Madeira Island (Portugal). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11.
- Sfara, V., Zerba, E.N., and Alzogaray, R.A. (2008). Decrease in DEET repellency caused by nitric oxide in *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 67, 1–8.
- Sfara, V., Mougabure-Cueto, G., Zerba, E.N., and Alzogaray, R.A. (2011). Adaptation of the repellency response to DEET in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* 57, 1431–1436.
- Sfara, V., Mougabure-Cueto, G.A., Zerba, E.N., and Alzogaray, R.A. (2013). Locomotor behaviour of *Blattella germanica* modified by DEET. *PLoS One* 8, e83433.
- Sfara, V., Mougabure-Cueto, G.A., and González-Audino, P.A. (2016). Modulation of the behavioral and electrical responses to the repellent DEET elicited by the pre-exposure to the same compound in *Blattella germanica*. *PeerJ* 2016.
- Shafer, T.J., Meyer, D.A., and Crofton, K.M. (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: Critical review and future research needs. *Environ. Health Perspect.* 113, 123–136.
- Shah, R.M., Alam, M., Ahmad, D., Waqas, M., Ali, Q., Binyamin, M., and Shad, S.A. (2016). Toxicity of 25 synthetic insecticides to the field population of *Culex quinquefasciatus* Say. *Parasitol. Res.* 115, 4345–4351.
- Shimada, S., Kamiya, M., Shigetou, S., Tomiyama, K., Komori, Y., Magara, L., Ihara, M., and Matsuda, K. (2020). The mechanism of loop C-neonicotinoid interactions at insect nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha$  1 subunit predicts resistance emergence in pests. *Sci. Reports* 2020 101 10, 1–8.
- Shute, G.T. (1956). A method of maintaining colonies of east african strains of *Anopheles gambiae*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 50, 92–94.
- Silva, A.P.B., Santos, J.M.M., and Martins, A.J. (2014). Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review. *Parasit. Vectors* 7, 450.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D.W., Giorio, C., Girolami, V., et al. (2015). Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 5–34.
- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., Gething, P.W., Kabaria, C.W., et al. (2010). The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasit. Vectors* 3, 117.

- Sinka, M.E., Bangs, M.J., Manguin, S., Rubio-Palis, Y., Chareonviriyaphap, T., Coetzee, M., Mbogo, C.M., Hemingway, J., Patil, A.P., Temperley, W.H., et al. (2012). A global map of dominant malaria vectors. *Parasites and Vectors* 5, 69.
- Smallegange, R.C., Qiu, Y.T., van Loon, J.A., and Takken, W. (2005). Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae). *Chem. Senses* 30, 145–152.
- Soderlund, D.M. (2008). Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. In *Pest Management Science*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 610–616.
- Soderlund, D.M. (2012). Molecular Mechanisms of Pyrethroid Insecticide Neurotoxicity: Recent Advances. *Arch. Toxicol.* 86, 165.
- Sokhna, C., Ndiath, M.O., and Rogier, C. (2013). The changes in mosquito vector behaviour and the emerging resistance to insecticides will challenge the decline of malaria. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 902–907.
- Sparks, J.T., and Dickens, J.C. (2016). Bitter-sensitive gustatory receptor neuron responds to chemically diverse insect repellents in the common malaria mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *Sci. Nat.* 103.
- Sparks, T.C., and Bryant, R.J. (2021). Crop protection compounds – trends and perspective. *Pest Manag. Sci.* 77, 3608–3616.
- Sparks, T.C., and Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic. Biochem. Physiol.* 121, 122–128.
- Sparks, J.T., Botsko, G., Swale, D.R., Boland, L.M., Patel, S.S., and Dickens, J.C. (2018). Membrane Proteins Mediating Reception and Transduction in Chemosensory Neurons in Mosquitoes. *Front. Physiol.* 9.
- Stanczyk, N.M., Brookfield, J.F.Y., Ignell, R., Logan, J.G., and Field, L.M. (2010). Behavioral insensitivity to DEET in *Aedes aegypti* is a genetically determined trait residing in changes in sensillum function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8575–8580.
- Stanczyk, N.M., Brookfield, J.F.Y., Field, L.M., and Logan, J.G. (2013). *Aedes aegypti* Mosquitoes Exhibit Decreased Repellency by DEET following Previous Exposure. *PLoS One* 8.
- Stokes, C., Treinin, M., and Papke, R.L. (2015). Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 514–523.
- Su, C.Y., Menuz, K., and Carlson, J.R. (2009). Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. *Cell* 139, 45–59.
- Subramanian, S., Rabindra, R.J., Palaniswamy, S., Sathiah, N., and Rajasekaran, B. (2005). Impact of granulovirus infection on susceptibility of *Spodoptera litura* to insecticides. *Biol. Control* 33, 165–172.

- Südhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509–547.
- 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.
- Syed, Z., and Leal, W.S. (2008). Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13598–13603.
- Szalai, G., Krishnamurthy, R., and Hajnóczky, G. (1999). Apoptosis driven by IP<sub>3</sub>-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J.* 18, 6349–6361.
- Taillebois, E., Cartereau, A., Jones, A.K., and Thany, S.H. (2018). Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pestic. Biochem. Physiol.* 151, 59–66.
- Takken, W., and Verhulst, N.O. (2013). Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 433–453.
- Tan, J., Galligan, J.J., and Hollingworth, R.M. (2007). Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *Neurotoxicology* 28, 829–842.
- 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 Pharmacol. Sci.* 28, 14–22.
- Thany, S.H., Courjaret, R., and Lapied, B. (2008). Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical  $\alpha$ -bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neurosci. Lett.* 438, 317–321.
- Thi, T., Trang, K., and Chaudhari, S. (2002). Bioassay of nuclear polyhedrosis virus (npv) and in combination with insecticide on *Spodoptera litura* (Fab). *Omonrice* 10, 45–53.
- 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 Biochem. Mol. Biol.* 122.
- Thomsen, E.K., Strobe, C., Hemmings, K., Hughes, A.J., Chanda, E., Musapa, M., Kamuliwo, M., Phiri, F.N., Muzia, L., Chanda, J., et al. (2014). Underpinning sustainable vector control through informed insecticide resistance management. *PLoS One* 9.
- Tison, L., Röbner, A., Gerschewski, S., and Menzel, R. (2019). The neonicotinoid clothianidin impairs memory processing in honey bees. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180, 139–145.
- Tomizawa, M., and Casida, J.E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268.
- Tsitoura, P., Koussis, K., and Iatrou, K. (2015). Inhibition of *Anopheles gambiae* odorant receptor function by mosquito repellents. *J. Biol. Chem.* 290, 7961–7972.
- Ujváry, I. (1999). Nicotine and Other Insecticidal Alkaloids. In *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, (Springer Japan), pp. 29–69.

- Vais, H., Williamson, M.S., Goodson, S.J., Devonshire, A.L., Warmke, J.W., Usherwood, P.N.R., and Cohen, C.J. (2000). Activation of Drosophila sodium channels promotes modification by deltamethrin: Reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations. *J. Gen. Physiol.* 115, 305–318.
- Valle, D., Bellinato, D.F., Viana-Medeiros, P.F., Lima, J.B.P., Martins, A. de J., and Junior (2019). Resistance to temephos and deltamethrin in *Aedes aegypti* from Brazil between 1985 and 2017. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 114.
- Velut, G., Dia, A., Briolant, S., Javelle, E., Pommier De Santi, V., Berger, F., Savini, H., Simon, F., Michel, R., and Pradines, B. (2018). Le paludisme : toujours d'actualité dans les armées françaises MALARIA: A TOPICAL ISSUE AMONG THE FRENCH ARMED FORCES. Article original. 46, 13–026.
- Viana, M., Hughes, A., Matthiopoulos, J., Ranson, H., and Ferguson, H.M. (2016). Delayed mortality effects cut the malaria transmission potential of insecticide-resistant mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 8975–8980.
- Vinauger, C., Lutz, E.K., and Riffell, J.A. (2014). Olfactory learning and memory in the disease vector mosquito *Aedes aegypti*. *J. Exp. Biol.* 217, 2321–2330.
- Vivekanandhan, P., Thendralmanikandan, A., Kweka, E.J., and Mahande, A.M. (2021). Resistance to temephos in *Anopheles stephensi* larvae is associated with increased cytochrome P450 and  $\alpha$ -esterase genes overexpression. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 2021 1–6.
- Vontas, J., Katsavou, E., and Mavridis, K. (2020). Cytochrome P450-based metabolic insecticide resistance in *Anopheles* and *Aedes* mosquito vectors: Muddying the waters. *Pestic. Biochem. Physiol.* 170, 104666.
- Wang, X., and Schwarz, T.L. (2009). The Mechanism of  $Ca^{2+}$ -Dependent Regulation of Kinesin-Mediated Mitochondrial Motility. *Cell* 136, 163–174.
- Wang, L., Nomura, Y., Du, Y., Liu, N., Zhorov, B.S., and Dong, K. (2015a). A mutation in the intracellular loop III/IV of mosquito sodium channel synergizes the effect of mutations in helix IIS6 on pyrethroid resistance. *Mol. Pharmacol.* 87, 421–429.
- Wang, X., Bao, H., Sun, H., Zhang, Y., Fang, J., Liu, Q., and Liu, Z. (2015b). Selective actions of Lynx proteins on different nicotinic acetylcholine receptors in the locust, *Locusta migratoria manilensis*. *J. Neurochem.* 134, 455–462.
- Watson, G.B., Siebert, M.W., Wang, N.X., Loso, M.R., Sparks, T.C., and Com, G.W. (2021). Sulfoxaflor-A sulfoximine insecticide: Review and analysis of mode of action, resistance and cross-resistance Sulfoxaflor-A Sulfoximine Insecticide: Review and Analysis of Mode of Action, Resistance and Cross-Resistance.
- Weedall, G.D., Mugenzi, L.M.J., Menze, B.D., Tchouakui, M., Ibrahim, S.S., Amvongo-Adjia, N., Irving, H., Wondji, M.J., Tchoupo, M., Djouaka, R., et al. (2019). A cytochrome P450 allele confers pyrethroid resistance on a major African malaria vector, reducing insecticide-treated bednet efficacy. *Sci. Transl. Med.* 11.



- Weill, M., Lutfalla, G., Mogensen, K., Chandre, F., Berthomieu, A., Berticat, C., Pasteur, N., Philips, A., Fort, P., and Raymond, M. (2003). Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423, 136–137.
- Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M., and Raymond, M. (2004). The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide. *Insect Mol. Biol.* 13, 1–7.
- Wicher, D., Walther, C., and Wicher, C. (2001). Non-synaptic ion channels in insects — basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog. Neurobiol.* 64, 431–525.
- 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 Negl. Trop. Dis.* 14, 1–31.
- Xia, Y., Wang, G., Buscariollo, D., Pitts, R.J., Wenger, H., and Zwiebel, L.J. (2008). The molecular and cellular basis of olfactory-driven behavior in *Anopheles gambiae* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6433–6438.
- Xie, T., Abrahamsson, K., Fogelqvist, E., and Josefsson, B. (1986). International Programme on Chemical Safety Environmental Health. Criteria 161: Phenol.
- Xu, P., Choo, Y.M., De La Rosa, A., and Leal, W.S. (2014). Mosquito odorant receptor for DEET and methyl jasmonate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 16592–16597.
- Xue, R. De, Ali, A., and Barnard, D.R. (2003). Laboratory evaluation of toxicity of 16 insect repellents in aerosol sprays to adult mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 19, 271–274.
- Yahouédo, G.A., Chandre, F., Rossignol, M., Ginibre, C., Balabanidou, V., Garcia, N., Mendez, 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* OPEN. *Sci. Rep.*
- Yamamoto, I. (1999). Nicotine to Nicotinoids: 1962 to 1997. In *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, (Springer Japan), pp. 3–27.
- Yang, B., Yao, X., Gu, S., Zhang, Y., Liu, Z., and Zhang, Y. (2010). Selectivity of lynx proteins on insect nicotinic acetylcholine receptors in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Mol. Biol.* 19, 283–289.
- Yang, J., Zhao, Z., Gu, M., Feng, X., and Xu, H. (2019). Release and uptake mechanisms of vesicular Ca<sup>2+</sup> stores. *Protein Cell* 10, 8–19.
- Yao, T.T., Wang, L.K., Cheng, J.L., Hu, Y.Z., Zhao, J.H., and Zhu, G.N. (2015). Optimization of pyrethroid and repellent on fabrics against *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*) using a microencapsulation technique. *Med. Vet. Entomol.* 29, 37–43.
- Young, S.J., Gunning, R. V., and Moores, G.D. (2005). The effect of piperonyl butoxide on pyrethroid-resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 61, 397–401.

- Yunta, C., Grisales, N., Nász, S., Hemmings, K., Pignatelli, P., Voice, M., Ranson, H., and Paine, M.J.I. (2016). Pyriproxyfen is metabolized by P450s associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 78, 50–57.
- Zhang, W., Holyoke, C.W., Barry, J., Leighty, R.M., Cordova, D., Vincent, D.R., Hughes, K.A., Tong, M.H.T., McCann, S.F., Xu, M., et al. (2016). Mesoionic pyrido[1,2-a]pyrimidinones: A novel class of insecticides inhibiting nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 26, 5444–5449.
- Zhou, X., Yang, C., Liu, N., Li, M., Tong, Y., Zeng, X., and Qiu, X. (2019). Knockdown resistance (kdr) mutations within seventeen field populations of *Aedes albopictus* from Beijing China: First report of a novel V1016G mutation and evolutionary origins of kdr haplotypes. *Parasites and Vectors* 12, 1–16.
- Zoh, D.D., Ahoua Alou, L.P., Toure, M., Pennetier, C., Camara, S., Traore, D.F., Koffi, A.A., Adja, A.M., Yapi, A., and Chandre, F. (2018). The current insecticide resistance status of *Anopheles gambiae* (s.l.) (Culicidae) in rural and urban areas of Bouaké, Côte d'Ivoire. *Parasites and Vectors* 11.
- Zoh, M.G., Bonneville, J., Tutagana, J., Laporte, F., Behi, K., Mouhamadou, C.S., Sadia, C., Mcbeath, J., Horstmann, S., Reynaud, S., et al. (2021). Neonicotinoid and pyrethroid combination: A tool to manage insecticide resistance in malaria vectors? Insights from experimental evolution. *BioRxiv* 2021.06.09.447494.
- Zuharah, W.F., and Sufian, M. (2021). The discovery of a novel knockdown resistance (kdr) mutation A1007G on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Malaysia. *Sci. Rep.* 11, 1–9.

## Table des illustrations

Figure 1 : Répartition géographique indiquant le nombre de cas de paludisme pour 1000 personnes à risque .....	15
Figure 2 : Photographies de 3 espèces représentatives des deux sous-familles de moustiques. ....	16
Figure 3 : Photographies de la face ventrale d'un œuf, de la face dorsale d'une larve, de la face latérale d'une nymphe et d'un adulte <i>An. gambiae</i> . ....	17
Figure 4 : Cycle de développement des anophèles.....	18
Figure 5 : Carte des déploiements opérationnels des forces armées françaises en 2020 .....	21
Figure 6 : Incidence du paludisme parmi les forces armées françaises .....	22
Figure 7 : Représentation des structures chimiques des principaux répulsifs chimiques utilisées en LAV.....	26
Figure 8 : Schéma d'une sensille contenant des neurones récepteurs olfactifs (NROs) .....	27
Figure 9 : Anatomie des organes impliqués dans la gustation chez le moustique .....	29
Figure 10 : Morphologie des sensilles gustatives. ....	29
Figure 11 : Représentation schématique des cibles des différentes classes d'insecticides dans une synapse d'insecte.....	36
Figure 12 : Mode d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase .....	37
Figure 13 : Variables d'activation et d'inactivation du canal sodium dépendant du potentiel....	39
Figure 14 : Représentation schématique de la structure de la sous-unité $\alpha$ du canal sodium dépendant du potentiel d'insecte (Modifié d'après Dong <i>et al.</i> , 2014).....	40
Figure 15 : Mode d'action des pyréthriinoïdes de type I et II). ....	41
Figure 16 : Les récepteurs cholinergiques de type nicotinique.....	43
Figure 17 : Représentation de la structure chimique des différents néonicotinoïdes .....	45
Figure 18 : Représentation de la structure chimique du triflumézopyrime et du dicloromézodiaz. ....	47
Figure 19 : Représentation de la structure chimique de 3 tautomères négatifs du triflumézopyrime .....	47
Figure 20 : Principaux mécanismes de résistance aux insecticides chimiques. ....	49
Figure 21 : Carte des résistances <i>kdr</i> et <i>ace-1R</i> rapportées par des bioessais OMS/CDC ou des publications chez les anophèles.....	54
Figure 22 : Localisation des mutations <i>kdr</i> dans la sous-unité para du canal sodium d' <i>An. gambiae</i> .....	55

Figure 23 : Mécanismes de résistance cuticulaire .....	57
Figure 24 : Changements comportementaux connus et à investiguer chez le moustique .....	60
Figure 25 : Illustration de la potentialisation de l'effet d'un insecticide par combinaison avec un agent synergisant .....	64
Figure 26 : Illustration de l'optimisation de l'effet des insecticides par l'utilisation d'un agent synergisant .....	65
Figure 27 : Organelles impliquées dans le stockage intracellulaire du calcium .....	67
Figure 28 : Exemple de signalisations dépendantes du calcium recrutées par les agents synergisant chimiques et biologiques .....	68
Figure 29 : Potentialisation de l'effet du DCJW par la deltaméthrine <i>in vitro</i> .....	73
Figure 30 : Modèle proposé pour la potentialisation de l'effet d'un carbamate par le DEET par recrutement de voies de signalisation intracellulaire calcium-dépendantes dans les neurones d'insectes.....	77
Figure 31 : Effet concentration-dépendant de l'IR3535 sur le M1 mAChR. Courbe effet log[IR3535] illustrant les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ mesurées en fonction de la concentration d'IR3535 utilisée sur les neurones DUM de la blatte <i>P. americana</i> .. ..	78
Figure 32 : Potentialisation de l'effet du thiaclopride par l'IR3535 à 10nM sur les DUM neurones de blattes <i>P. americana</i> .....	79
Figure 33 : Protocole de dissociation mécanique des têtes de moustiques pour obtenir les corps cellulaires des neurones isolés .....	86
Figure 34 : Schéma représentatif des différentes configurations possibles avec la technique du patch-clamp .....	88
Figure 35 : Fonctionnement de l'amplificateur de patch.....	90
Figure 36 : Représentation schématique de l'installation d'un poste de patch-clamp .....	91
Figure 37 : Représentation de la structure chimique de la sonde Fura-2 libre et liée à un ion calcium et spectre d'excitation de la sonde Fura-2 sous sa forme libre (380 nm) et sous sa forme liée au calcium (340nm). .....	97
Figure 38 : Représentation schématique de l'installation d'un poste d'imagerie calcique et visualisation des variations de la $[Ca^{2+}]_i$ par l'application de pseudo-couleurs grâce au logiciel Imaging Workbench v6. ....	98
Figure 39 : Schéma des mix de RT-qPCR en une et deux étapes .....	100
Figure 40 : Tri des larves d' <i>An. gambiae</i> pour les tests larvaires. ....	103
Figure 41 : Effet de l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. A) Structure chimique de l'ACh .....	109

Figure 42 : Histogrammes comparatifs illustrant l'effet de l'application par le bain d' $\alpha$ -bgt à 100nM pendant 5 minutes sur l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. .... 110

Figure 43 : Superposition des courbes effet-log concentration d'ACh réalisées à partir de la mesure de l'amplitude des courants ioniques enregistrés sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis ..... 111

Figure 44 : Histogrammes comparatifs illustrant l'amplitude du courant ionique entrant induit par l'ACh à 30 $\mu$ M sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis.. ..... 112

Figure 45 : Histogrammes comparatifs illustrant la durée du courant ionique entrant mesurée à 50% de l'amplitude maximum induit par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. .... 114

Figure 46 : Histogrammes comparatifs illustrant l'effet d'un prétraitement de 2 minutes avec le propoxur à 100nM sur l'amplitude du courant ionique entrant et la durée du courant mesurée à 50% de l'amplitude maximum induit par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ..... 115

Figure 47 : Temps au pic du courant ionique entrant induit par l'ACh 1mM sur les neurones Kis et AcerKis ..... 116

Figure 48 : Mesure du diamètre du corps cellulaire, de la quantité de charges et de la densité de courant passant par les nAChRs des neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ..... 117

Figure 49 : Etude des courants capacitifs générés par l'application d'un échelon de potentiel hyperpolarisant sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ..... 119

Figure 50 : Effet du CdCl<sub>2</sub> sur les variations de calcium induites par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ..... 121

Figure 51 : Histogrammes comparatifs illustrant l'effet sur la variation de calcium de l'application d'ACh à 1mM pendant 5 minutes sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis chargés en Fura-2 en condition contrôle et après un prétraitement de 5 minutes avec une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium « calcium-free »..... 122

Figure 52 : Histogrammes comparatifs illustrant la quantification par RT-qPCR de l'expression relative des ARNm des canaux Ca<sub>v</sub> par rapport aux gènes de référence rps7 et actine sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ..... 123

Figure 53 : Dépolarisation induite par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ..... 123

Figure 54 : Caractérisation du courant calcique résultant de l'activation des canaux Ca<sub>v</sub> exprimés par les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ..... 125

Figure 55 : Etude électrophysiologique de l'implication du calcium extracellulaire dans l'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. .... 127

Figure 56 : Etude électrophysiologique de la perméabilité au calcium des nAChRs exprimés par les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ..... 129

Figure 57 : Influence du calcium extracellulaire sur la conductance des nAChRs exprimés par les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis.. ..... 130

Figure 58 : Etude de l'effet de la nicotine à 100µM sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ..... 131

Figure 59 : Effet de l'α-bgt sur le courant ionique entrant induit par la nicotine sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis ..... 132

Figure 60 : Illustration d'un courant sodium induit par une dépolarisation sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis à l'aide du protocole de potentiel imposé représenté au-dessus des courants ..... 134

Figure 61 : Etude de la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'amplitude de la phase d'activation du courant sodique du canal Nav dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis ..... 135

Figure 62 : Etude électrophysiologiques des propriétés d'activation et d'inactivation à l'état stable des canaux Nav dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis..... 137

Figure 63 : Etude de la dépendance vis-à-vis du potentiel de l'amplitude de la phase maintenue du courant sodique du canal Nav dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis ..... 139

Figure 64 : Etude électrophysiologiques des propriétés d'activation de la phase maintenue du courant sodique dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis..... 139

Figure 65 : Histogrammes comparatifs illustrant la valeur du potentiel de membrane au repos dans des conditions de courant imposé sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis . 141

Figure 66 : Dépendance vis-à-vis du potentiel (Vm) de l'inactivation à l'état stable (I/Imax) des canaux CaV sur les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. .... 143

Figure 67 : Influence de la  $[Ca^{2+}]_i$  basale sur l'amplitude du courant ionique induit par l'ACh à faible concentration ..... 144

Figure 68 : Effet de la CLO à 100µM sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis ..... 146

Figure 69 : Dépendance vis-à-vis de la concentration de l'effet de la CLO sur les neurones isolés de moustiques Kis ..... 147

Figure 70 : Histogrammes comparatifs illustrant l'effet sur la variation de calcium de l'application de CLO à 0,1nM pendant 5 minutes sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis chargés en Fura-2AM..... 148

Figure 71 : Effet d'une concentration croissante de TRIF sur le courant ionique entrant induit par l'ACh à 1mM sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis.....	150
Figure 72 : Effet du TRIF à 1nM sur les variations de calcium intracellulaire sur les neurones isolés de moustiques KdrKis .....	151
Figure 73 : Effet du TRIF à 1nM sur les variations de calcium intracellulaire induite par l'ACh à différentes concentrations sur les neurones isolés de moustiques KdrKis .....	152
Figure 74 : Concentration létale de clothianidine (CLO) induisant 30%, 50% et 95% de mortalité (respectivement CL <sub>30</sub> ; CL <sub>50</sub> ; CL <sub>95</sub> ) chez des larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis après 48h d'exposition .....	155
Figure 75 : Concentration létale de triflumézopyrime (TRIF) induisant 30%, 50% et 95% de mortalité (respectivement CL <sub>30</sub> ; CL <sub>50</sub> ; CL <sub>95</sub> ) chez des larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis après 48h d'exposition .....	157
Figure 76 : Effet sur la mortalité de l'exposition des larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis après 24 et 48h de contact avec une concentration croissante d'IR3535 (1 à 6 g/L) ..	159
Figure 77 : Proposition d'un modèle reprenant l'expression d'une population différente de nAChRs dans les neurones isolés de moustiques AcerKis et les conséquences cellulaires et moléculaires occasionnées au niveau neuronal par la mutation G119S. ....	169
Figure 78 : Proposition d'un modèle reprenant la modification de l'efficacité de l'ACh sur les nAChRs exprimés par les neurones isolés de moustiques KdrKis et les conséquences cellulaires et moléculaires occasionnées par la mutation L1014F au niveau neuronal. ....	171

## Table des tableaux

Tableau 1 : Importance relative des maladies infectieuses touchant les militaires français en 2015 .....	22
Tableau 2 : Classement des 32 substances actives utilisables en LAV .....	35
Tableau 3 : Mécanismes de résistance associés aux différentes classes d'insecticides utilisées en LAV. ....	50
Tableau 4 : Caractéristiques des synergistes et des agents synergisants. ....	69
Tableau 5 : Comparaison de l'effet de la deltaméthrine seule et en combinaison avec du PBO et un néonicotinoïde sur une souche d' <i>A. aegypti</i> résistante aux pyréthrinoïdes .....	72
Tableau 6 : Cibles membranaires d'insecticides exprimés par les neurones isolés de moustiques <i>An. gambiae</i> . ....	84
Tableau 7 : Composition du milieu de survie utilisé pour la dissociation neuronale. ....	85
Tableau 8 : Composition des solutions intrapipettes utilisées dans les expériences de patch-clamp. ....	95
Tableau 9 : Composition des solutions extracellulaires utilisées dans les expériences de patch-clamp. ....	95
Tableau 10 : Séquences des amorces utilisées dans les expériences de RT-qPCR. ....	101
Tableau 11 : Données électrophysiologiques et pharmacologiques issues de l'étude de l'effet de l'ACh sur les neurones isolés de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis. ....	112
Tableau 12 : Données électrophysiologiques issus de la caractérisation des courants calciques résultants de l'activation des canaux $Ca_v$ sur les neurones isolés de moustiques Kis et AcerKis. ....	125
Tableau 13 : Dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation et de l'inactivation des courants sodiques dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. ....	138
Tableau 14 : Dépendance vis-à-vis du potentiel de l'activation de la première phase de la courbe d'activation mesurée au pic du courant sodium et de la phase maintenue du courant sodium dans les neurones isolés de moustiques Kis et KdrKis. ....	140
Tableau 15 : Efficacité de la clothianidine sur les larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis .....	155
Tableau 16 : Efficacité du triflumézopyrime sur les larves de moustiques souches Kis, AcerKis et KdrKis .....	157
Tableau 17 : Mortalité induite par l'IR3535 à 4g/L sur les larves de moustiques Kis, AcerKis et KdrKis après 24 et 48h d'exposition.....	159



Tableau 18 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>50</sub> à 48h (0,019mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche Kis ..... 160

Tableau 19 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>50</sub> à 48h (0,012mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche AcerKis ..... 161

Tableau 20 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>50</sub> à 48h (0,029mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche KdrKis..... 162

Tableau 21 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>30</sub> à 48h (0,015mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche Kis ..... 163

Tableau 22 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>30</sub> à 48h (0,008mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche AcerKis ..... 164

Tableau 23 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison de la CLO à la CL<sub>30</sub> à 48h (0,018mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche KdrKis..... 165

Tableau 24 : Comparaison de la mortalité attendue et observée induite à 24 et à 48h par la combinaison du TRIF à la CL<sub>50</sub> à 48h (0,5mg/L) avec l'IR3535 dans une gamme de concentrations allant de 1 à 4g/L sur les larves de moustiques souche Kis..... 166



OPEN

# Orthosteric muscarinic receptor activation by the insect repellent IR3535 opens new prospects in insecticide-based vector control

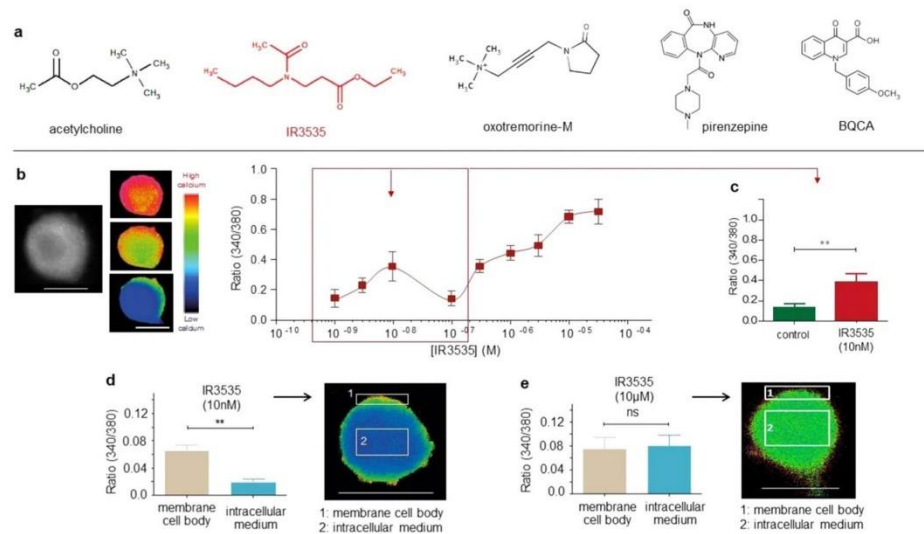
Eléonore Moreau<sup>1</sup>, Karolina Mikulska-Ruminska<sup>2</sup>, Mathilde Goulu<sup>1</sup>, Stéphane Perrier<sup>1</sup>, Caroline Deshayes<sup>1</sup>, Maria Stankiewicz<sup>3</sup>, Véronique Apaire-Marchais<sup>1</sup>, Wieslaw Nowak<sup>2</sup> & Bruno Lapied<sup>1✉</sup>

The insect repellent IR3535 is one of the important alternative in the fight against mosquito-borne disease such as malaria, dengue, chikungunya, yellow fever and Zika. Using a multidisciplinary approach, we propose the development of an innovative insecticide-based vector control strategy using an unexplored property of IR3535. We have demonstrated that in insect neurosecretory cells, very low concentration of IR3535 induces intracellular calcium rise through cellular mechanisms involving orthosteric/allosteric sites of the M1-muscarinic receptor subtype, G protein  $\beta\gamma$  subunits, background potassium channel inhibition generating depolarization, which induces voltage-gated calcium channel activation. The resulting internal calcium concentration elevation increases nicotinic receptor sensitivity to the neonicotinoid insecticide thiacloprid. The synergistic interaction between IR3535 and thiacloprid contributes to significantly increase the efficacy of the treatment while reducing concentrations. In this context, IR3535, used as a synergistic agent, seems to promise a new approach in the optimization of the integrated vector management for vector control.

Mosquito-biting rates represent a major concern in overall vector capacity. It is possible to drastically lower the spread of mosquito-borne disease by disrupting host-seeking and feeding<sup>1,2</sup>. Therefore, repellents represent an important alternative in the fight against mosquito-borne disease such as malaria, dengue, chikungunya, yellow fever and Zika<sup>3</sup>. Modes of action of the most commonly used insect repellents such as DEET, IR3535, picaridin characterized so far are diverse. They can i) elicit deterrent feeding behavior, ii) modulate mosquito behavior through gustatory mechanism effect *via* gustatory receptor neurons<sup>4,5</sup> and iii) affect olfactory mechanism of action involving transmembrane odorant receptor proteins<sup>6–8</sup> located in olfactory receptor neurons<sup>9–17</sup>.

Recent studies indicate that some repellent chemicals, such as DEET can also directly act on both insect peripheral and central nervous systems. They induce locomotor activity disruption, neuroexcitation (*via* octopamine receptors), cholinergic system alterations (e.g., acetylcholinesterase inhibition and M1/M3 muscarinic acetylcholine receptor subtype interactions) and monoxygenase regulation<sup>17–22</sup>. This demonstrates that repellents can modulate multiple physiological functions through complex mechanisms. Unfortunately, the precise mechanisms of how these chemicals modulate the specific molecular targets in insects still remain elusive, contested and/or misunderstood. Exploring precisely the mode of action of such compounds may lead to new more effective alternatives in the Insect Resistance Management for preventing the spread of mosquito-borne diseases. In this context, we commonly use cockroach neurosecretory cells identified as dorsal unpaired median (DUM) neurons to explore the “non-classical” effects of repellents<sup>18,22</sup>. Because DUM neurons are well known in the literature to co-express multiple membrane receptors and/or ion channels targeted by repellents and insecticides, they represent a suitable model to investigate unexpected actions of the repellents<sup>22</sup>. Previous studies performed in DUM neurons, have indicated that mixing low concentration of the repellent DEET, used as a synergistic agent,

<sup>1</sup>Laboratoire Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et des Récepteurs (SIFCIR), UPRES EA 2647, USC INRA 1330, SFR QUASAV 4207, UFR Sciences, Université d'Angers, 2 boulevard Lavoisier, 49045, Angers, cedex, France. <sup>2</sup>Institute of Physics, Faculty of Physics, Astronomy and Informatics, N. Copernicus University, Torun, Poland. <sup>3</sup>Faculty of Biological and Veterinary Sciences, N. Copernicus University, Torun, Poland. ✉e-mail: bruno.lapied@univ-angers.fr



**Figure 1.** The insect repellent IR3535 induces a non-monotonic concentration-dependent intracellular calcium rise in insect DUM neurosecretory cell body. (a) The chemical structure of acetylcholine is shown together with the structure of the repellent IR3535, the selective M1-mAChR subtype agonist oxotremorine-M, the selective M1-mAChR subtype antagonist pirenzepine and the selective positive allosteric modulator of the M1-mAChR subtype (BQCA). (b) Bath application of IR3535 produces a multiphasic semi-logarithmic concentration-response curve with the first component reaching a maximum effect obtained at very low concentration (i.e., 10 nM IR3535; square and arrow) as illustrated in comparative histogram in (c). (d) Images of Fura-2 fluorescence of a single DUM neuron cell body after application of 10 nM IR3535. The elevation in intracellular calcium concentration is measured in parallel at the membrane cell body level (1) and at the intracellular medium level (2). Note that low concentration of IR3535 (10 nM) only induces calcium response in the membrane cell body region. (e) Comparative histograms illustrating that higher concentrations of IR3535 (i.e., 10 μM) produce intracellular calcium rise at both membrane cell body and intracellular medium levels. Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$ ); statistical test is Student unpaired t-test  $**p < 0.01$ ; ns, non significant. Scale bar 55 μm.

and the non-pyrethroid insecticide, propoxur, leads to improvement in the effect of propoxur<sup>18</sup>. We have also confirmed that this mixture increases the efficiency of treatments against *Aedes aegypti* mosquitoes *via* a complex calcium-dependent intracellular signaling pathway<sup>18</sup>.

In the present study, we have demonstrated that another repellent, IR3535, induces intracellular calcium rise through novel cellular mechanisms involving orthosteric/allosteric sites of the M1-muscarinic receptor subtype (M1-mAChR), G protein  $\alpha\beta\gamma$  subunits, background potassium channels and voltage-gated calcium channels. This unexpected mode of action makes IR3535 a suitable candidate as a synergistic agent to increase insect sensitivity to insecticides<sup>23,24</sup>.

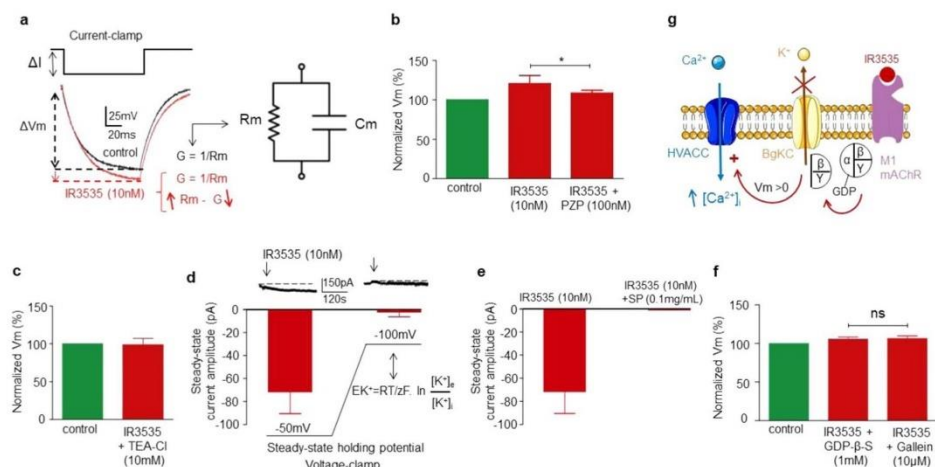
## Results

### The insect repellent IR3535 induces multiphasic effects on intracellular calcium concentration.

The results illustrated in Fig. 1b, suggested an atypical mode of action of IR3535 (Fig. 1a) in isolated DUM neurons. Using calcium imaging, we showed that bath application of IR3535 induced multiphasic intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) rise, depending on the concentrations tested. The mean ratios plotted against the logarithm of the non-cum

ulative concentration of IR3535 revealed an unexpected first component recognized as a « bell-shaped » two processes model involving an increase and a decrease phase between  $10^{-9}$ M and  $10^{-7}$ M, with a maximum reached at  $10^{-8}$ M (Fig. 1b,c). For higher concentrations than  $10^{-7}$ M, IR3535 further increased  $[Ca^{2+}]_i$  before reaching maximum effects obtained at  $10^{-5}$ M (Fig. 1b). This non-monotonic concentration-response relationship suggested the activation of several membrane and/or intracellular mechanisms involved in the calcium influx and/or calcium release activated by, for instance, upstream G-protein coupled receptors (GPCRs) activation, depending on the concentration of IR3535. After careful observation of the calcium response induced by IR3535, we observed a spatial heterogeneity in the calcium signal according to both the cell region and the concentration of IR3535 (Fig. 1d,e). As illustrated in Fig. 1d, the elevation in  $[Ca^{2+}]_i$  was detected and quantified in two defined fields at membrane cell body level (1) and in the intracellular medium (2). At very low concentration of IR3535 (10 nM), cytofluorescence intensity was only increased at cell membrane level of the DUM neuron whereas there was never significant calcium variation in the intracellular medium (Fig. 1d). By contrast, for

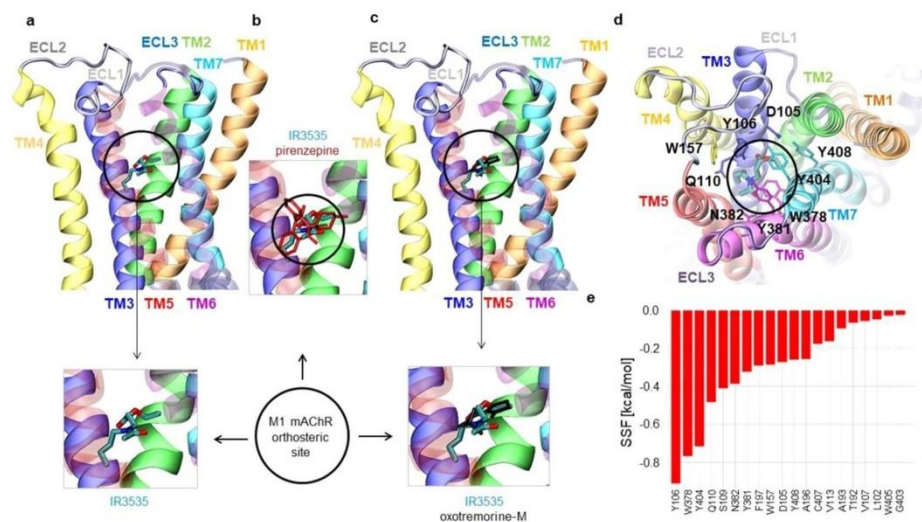




**Figure 3.** Involvement of the background potassium channel inhibition through a  $G\beta\gamma$ -dependent mechanism in the IR3535-induced calcium rise. (a) IR3535 (10 nM) induces an increase of the input membrane resistance studied under current-clamp in response to a 100-ms hyperpolarizing current pulse. Reduced equivalent circuit of the DUM neuron cell body plasma membrane obtained by combining a fixed capacitance ( $C_m$ ) in parallel with ion-specific pathway ( $R_m$ ). The reciprocal of electrical membrane resistance ( $R_m$ ) is conductance ( $G$ ). If the resistance to movement of ion across the membrane is high then the conductance of the membrane to this particular ion is low. (b) Histogram summarizing the membrane potential recorded in response to a hyperpolarizing current pulse (100 ms in duration) in control and in the presence of IR3535 (10 nM) and pirenzepine (PZP). (c,d) Involvement of background potassium channels (BgKC) in the effect of IR3535. IR3535-induced increase of the input membrane resistance is completely inhibited by the potassium channel blocker TEA-Cl (c). Because BgKC, open at the resting state (i.e.,  $-50$  mV), mediates a permanent spontaneous outward potassium conductance, the resulting steady-state inwardly directed current recorded, under voltage-clamp, in the presence of IR3535 (10 nM) correlate well with the switch from the open to closed state of potassium channels (d). (d,e) This inward current amplitude is strongly reduced when the holding membrane potential is hyperpolarized to  $-100$  mV, which corresponds to the calculated Nernstian equilibrium potential for potassium ions ( $-100.8$  mV, in our experimental conditions) (d) and in the presence of SP-related peptide (0.1 mg/mL), known to inhibit binding of G proteins to mAChR (e). (f) Histograms illustrating the involvement of  $G\beta\gamma$  protein in IR3535-induced increase of the input membrane resistance recorded following intracellularly applied GDP- $\beta$ -S and gallein, a specific  $G\beta\gamma$  dimer signaling inhibitor. (g) Hypothetic scheme illustrating the participation of the molecular events involved in the effect of IR3535 *via* M1 muscarinic acetylcholine receptor subtype (M1-mAChR) activation. IR3535 induces inhibition of BgKC through  $G\beta\gamma$ -dependent mechanism. This produces membrane depolarization ( $V_m > 0$ ) and activation of high voltage-activated calcium channel (HVACC), resulting in the intracellular calcium rise. Individual controls were normalized as percentage of control. Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5$ ); statistical test is Student unpaired t-test \* $p < 0.05$ ; ns, non significant.

at room temperature (Fig. 2d). Bath application of 10 nM IR3535 produced a slight depolarization (3–5 mV; Fig. 2e) associated with a significant increase in the action potential discharge frequency (Fig. 2f). The blocking action of 100 nM pirenzepine (Fig. 2g) and the lack of effect of U73122 (10  $\mu$ M; Fig. 2h), which is an inhibitor of PLC-dependent processes triggered by M1-mAChR activation together with previous results (Fig. 2a,b,c) confirm the involvement of M1-mAChRs and the absence of classical signaling pathway activation (Fig. 2i).

**$G\beta\gamma$  subunits relay signal from M1-mAChR orthosteric site to background potassium channels.** DUM neurons are characterized by a membrane potential depending on the external concentration of both potassium and sodium<sup>25,27</sup>. We previously illustrated that IR3535 (10 nM) induced depolarization associated with an increase in the action potential discharge frequency (Fig. 2d,e,f). To ensure that the depolarization observed was due to an activation or an inhibition of the resting conductances, we tested the effect of 10 nM IR3535 on the DUM neuron input membrane resistance, under current-clamp condition (Fig. 3a). IR3535 produced a significant increase in the input membrane resistance in response to a hyperpolarizing current pulse (100 ms in duration; Fig. 3a,b), which was completely blocked by pirenzepine (100 nM; Fig. 3b). This indicated that the depolarization mediated by M1-mAChR activation was due to the loss of a hyperpolarizing resting conductance. In other words, the inhibition of background potassium channels (BgKC) involved in the maintenance of the membrane potential could account for the membrane depolarization observed in the presence of IR3535. This was substantiated by two sets of experiments performed in both current- and voltage-clamp. First, the

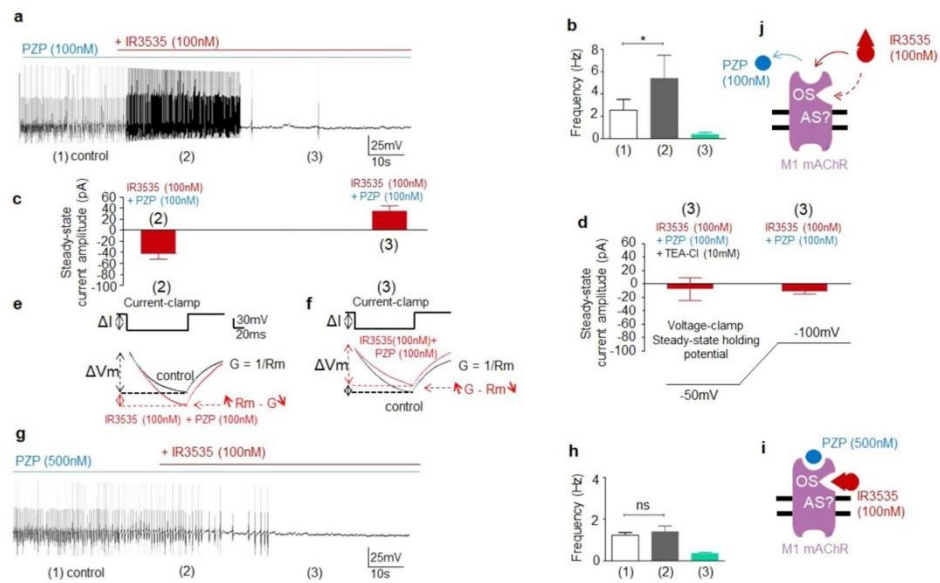


**Figure 4.** Computational docking results of ligands interactions at the orthosteric site of M1 mACh receptor. The highest affinity poses of: (a) IR3535 (black circle), (b) pirenzepine (red sticks) and (c) oxotremorine-M (black sticks) located at the orthosteric site of M1-mAChR. The mean value and standard deviation of binding energy are calculated for each ligand based on the five runs. The energy of binding is respectively:  $(-6.2 \pm 0.4)$  kcal/mol for IR3535,  $(-7.9 \pm 0.4)$  kcal/mol for pirenzepine and  $(-5.9 \pm 0.6)$  kcal/mol for oxotremorine-M. (d) Close-up view of the highest affinity pose of IR3535 from the top view of M1-mAChR. Residues observed in the close vicinity of IR3535 are displayed in stick representation and coded by the color of transmembrane helices: TM1 - orange, TM2 - green, TM3 - dark blue, TM4 - yellow, TM5 - red, TM6 - magenta, TM7 - light blue. (e) Residues with the highest contribution to the energy of binding of IR3535 at the orthosteric site of M1-mAChR.

IR3535-induced increase in the input membrane resistance was inhibited in the presence of the potassium channel blocker TEA-Cl (10 mM; Fig. 3c). Second, voltage-clamp experiments performed at a steady-state holding potential of  $-50$  mV revealed that application of IR3535 (10 nM) generated an inward current, which completely disappeared when a steady-state hyperpolarization imposed upon the DUM neuron to bring its resting potential to  $-100$  mV. A value, which was very close to the calculated Nernstian equilibrium potential for potassium ions ( $-100.8$  mV, in our experimental condition; Fig. 3d). In fact, and according to the results presented in Fig. 3a,c, the inwardly directed current observed after IR3535 (10 nM) correlated well with the inhibition of the spontaneous potassium conductance and the consecutive increase in input membrane resistance. These results confirm that IR3535, acting through activation of M1-mAChR, is able to inhibit BgKC, which thereby induce depolarization capable of activating calcium influx *via* HVA calcium channels (Fig. 3g).

The question that still arised was to determine how M1-mAChRs activated by low concentration of IR3535 were connected to BgKC. It is well recognized that ligand binding to M1-mACh receptors initiates G protein-dependent activation of PLC and consequent generation of IP3 and diacylglycerol. We demonstrated that this signaling pathway was not activated in the presence of 10 nM IR3535 (Fig. 2). However, G proteins can also act on ionic channels in a direct manner<sup>26</sup>. We next focused on the characterization of the cellular mechanisms involved in the direct G protein-dependent modulation of BgKC activity following activation of M1-mAChR. Experiments were performed using [D-Trp7,9,10]-substance P, a substance P-related peptide (SP) that inhibits binding of G proteins to mAChR. As shown in Fig. 3e, SP (0.1 mg/mL), intracellularly applied through the patch pipette, completely blocked the IR3535-induced inward current recorded at a steady-state holding potential of  $-50$  mV. In addition, experiments were performed under current-clamp, using GDP- $\beta$ -S, a non-hydrolysable GDP analog (Fig. 3f). It is assumed that in the absence of receptor stimulation, the heterotrimeric G protein  $G_{\alpha}$  and  $G_{\beta\gamma}$  subunits remain associated in a GDP-bound, an inactive form physically dissociated from the receptor. IR3535 binding to the M1-mAChR should initiate conformational changes allowing coupling with  $G_{\alpha\beta\gamma}$ . This would promote a conformational change in  $G_{\alpha}$ , which induces GDP release. In this case, GTP binds to  $G_{\alpha}$  and GDP/GTP exchange drives the dissociation of  $G_{\alpha}$  from  $G_{\beta\gamma}$ , switching its conformation to the active state. As shown in Fig. 3f, GDP- $\beta$ -S (1 mM), intracellularly applied through the patch pipette, completely blocked the increase in the input membrane resistance produced by IR3535 (Fig. 3b). All together, these results indicate that inhibition of BgKC by M1-mAChR activation could involve G protein and subsequent  $G_{\alpha}$  and  $G_{\beta\gamma}$  subunits dissociation. We previously reported that  $G_{\alpha}$  activation was not involved in the IR3535-induced intracellular calcium rise (Fig. 2b,c,h). Therefore, we examined whether increase in the input membrane resistance can be blocked by pretreatment with a  $G_{\beta\gamma}$  blocker, gallein<sup>29-31</sup>. Interestingly, similar results to those of GDP- $\beta$ -S

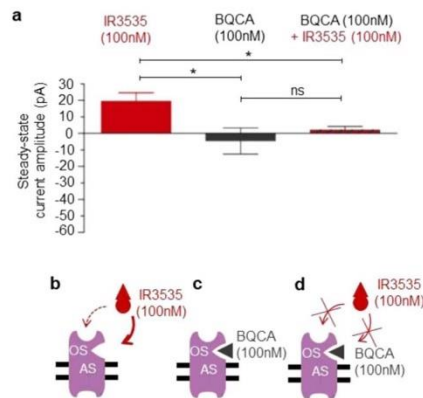




**Figure 5.** High concentration of IR3535 generates outward potassium current following the early inward current. **(a)** Under current-clamp, in control condition (1) and in the presence of pirenzepine (PZP, 100 nM), IR3535 (100 nM) produces a dual effect on DUM neuron action potential discharge frequency. The first effect corresponds to an increase of the action potential frequency (2), followed by an important reduction (3). **(b)** Histogram representing the dual effect of IR3535 (100 nM) on spontaneous electrical activity, recorded at different times of exposure, as indicated. **(c)** Under voltage-clamp, at a holding potential of  $-50$  mV and in the presence of pirenzepine (PZP, 100 nM), IR3535 (100 nM) induces an early steady-state inward current (2) followed by an outwardly directed current (3). **(d)** The outward current (3) is reduced in the presence of TEA-Cl (10 mM) and when the resting membrane potential is hyperpolarized to  $-100$  mV, corresponding to the calculated Nernstian equilibrium potential for potassium ions ( $-100.8$  mV). **(e, f)** IR3535 (100 nM) induces an increase (2) and a decrease (3) in the input membrane resistance studied under current-clamp in response to a 100-ms hyperpolarizing current pulse. Both inward (2) and outward (3) currents correlate well with the increase (2) and decrease (3) in the input membrane resistance, which thereby influence the action potential discharge frequency. **(g)** Spontaneous action potentials recorded in the presence of pirenzepine (PZP; 500 nM) and after bath application of IR3535 (100 nM). **(h)** Histogram illustrating the effects of bath application of IR3535 (100 nM) on DUM neuron cell body action potential discharge frequency, pretreated with PZP (500 nM); (1) control. After 15 s of exposure, the pacemaker activity decreases (2) and then finally stops (3). The increase in the action potential discharge frequency is never observed with PZP used at 500 nM. Data are shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6-8$ ), statistical test is Student unpaired t-test  $*p < 0.05$ ; ns, non significant. **(i, j)** Schemes suggesting that high concentration of IR3535 could interact with two distinct sites (i.e., orthosteric (OS) and putative allosteric (AS) sites) on M1-mAChR. In addition, high concentration of IR3535 (100 nM) can displace PZP from orthosteric site (j) indicating that more concentration of PZP is required to get full effect on orthosteric site (i, j).

were obtained with gallein (10  $\mu$ M; Fig. 3f). Based on these results, we propose that the release of  $G\beta\gamma$  following M1-mAChR orthosteric site activation by IR3535 (10 nM) mediates the inhibition of the BgKC, which thereby initiate depolarization necessary to produce calcium influx through HVA calcium channel activation (Fig. 3g).

Based on experiments illustrated in Figs. 2 and 3, it is suggested that IR3535 used at low concentration (10 nM) interacts with M1-mAChR orthosteric site. To substantiate this hypothesis, computational molecular docking of IR3535 together with pirenzepine and oxotremorine-M, known to act on M1-mAChR orthosteric site, was performed (Fig. 4; Supplementary Figure 1a). M1-mAChR is a bundle of seven-transmembrane  $\alpha$ -helices. Their transmembrane central parts form a broad cavity capable of adopting acetylcholine or other relatively small ligands. The volume of this pocket, estimated by using POCASA server<sup>32</sup> is 3640  $\text{\AA}^3$  (PDB code: 5cxv). Ligands can affect the receptor structure and dynamics by binding to the orthosteric (OS) and/or allosteric site (AS). In order to gain structural insights into the receptor-ligand interactions and explain the *in vitro* observed effects, we examined the interactions of several ligands: (i) IR3535 (ii) pirenzepine, (iii) oxotremorine-M (see Fig. 1a and Supplementary Figure 1b, c, d), with M1-mAChR. The strength of interactions of IR3535 with the M1-mAChR at the OS (Fig. 4a, d), were estimated as a calculated value of SFF parameter. These computed interactions, were

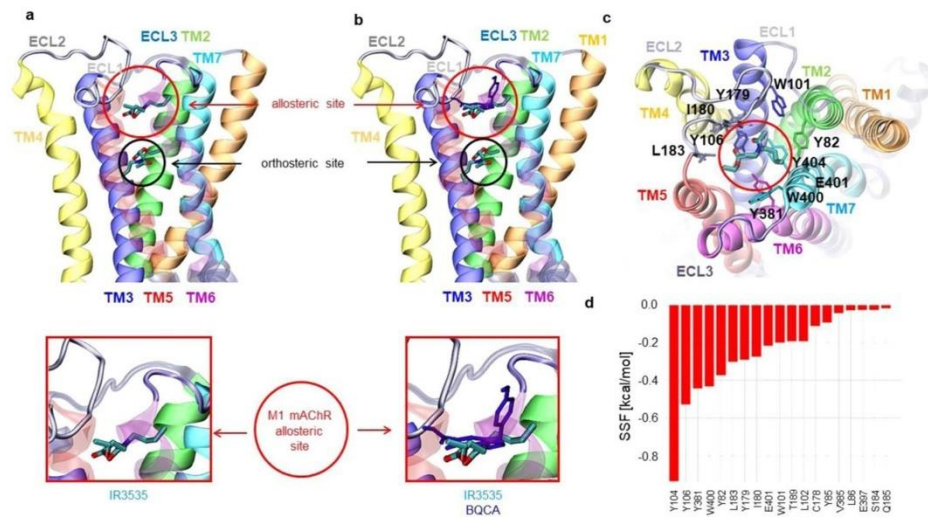


**Figure 6.** High concentration of IR3535 interacts with the allosteric site on M1-mAChR. **(a)** Comparative histogram showing the inhibition of the outward potassium current, recorded under voltage-clamp at a holding potential of  $-50\text{mV}$ , induced by IR3535 (100 nM) by pretreatment with the well known M1-mAChR allosteric modulator BQCA (100 nM). In the absence of orthosteric site agonist, BQCA (100 nM) applied alone has no significant effect. It is interesting to note that in the presence of BQCA, IR3535 (100 nM) never generates inward current, reflecting the activation of orthosteric site. Average data is shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5-7$ ), statistical test is Student unpaired t-test  $*p < 0.05$ ; ns, non significant. **(b-d)** Hypothetic schemes illustrating that i) the high selective allosteric modulator of M1-mAChR, BQCA completely inhibits the outward current induced by IR3535 (100 nM) and ii) high concentration of IR3535 (100 nM) could also interact with a different site than the M1-mAChR orthosteric site on M1-mAChR, reinforcing the involvement of allosteric binding site in the complex effect of IR3535.

found to be stronger in OS than in the AS (see Fig. 7a,c),  $-6.2$  versus  $-5.1$  kcal/mol. Of particular interest were three residues in OS, Y106, W378 and Y404, located in the close proximity of IR3535 (Fig. 4d,e; Supplementary Figure 1a), which gave the highest contribution to the energy of binding (Fig. 4e). Also a high score was calculated for Q110, S109, N382, Y381, F197, D105, W157, Y408, and A196 which contributed to the compound's stabilization. Other residues located within a 6 Å distance from IR3535 did not contribute to the SSF substantially (Fig. 4e). The orthosteric site pose of IR3535 was in a good agreement with the highest affinity pose of pirenzepine (Fig. 4b, red sticks) and oxotremorine-M (Fig. 4c, black sticks). The calculated binding affinity of oxotremorine-M to M1-mAChR was comparable to IR3535 whereas the binding energy of pirenzepine was almost twice as high. Notably, IR3535 binding results in 8% reduction of the OS estimated volume, while pirenzepine occupied more space and this reduction was 16% (Supplementary Figure 1b, c, d). It should be noted that these detailed computer modeling results can not be compared with radiolabeled ligands binding due to the lack of experimental data.

**Bell-shaped concentration-effect relationships of IR3535, recorded at low concentrations, result from an interaction with a M1-mAChR allosteric site.** The bell-shaped concentration-effect relationships (Fig. 1b) might be analyzed under the assumption that M1-mAChR could have a high affinity activation site and a low affinity « inhibition » site. A possible explanation for this bell-shaped curve would be the presence of an « inhibitory » component activated by higher concentration of IR3535 (i.e., 100 nM). This hypothetical « inhibitory » component could be mediated *via* the same M1-mAChR that modulates the stimulatory component, meaning the involvement of a M1-mAChR allosteric site. We therefore examined the effects of 100 nM IR3535 under current-clamp. Experiments performed with pirenzepine used at 100 nM revealed a dual effect of IR3535 (100 nM; Fig. 5a) dissected into two main phases. The first phase corresponded to an increase in the action potential discharge frequency induced by IR3535 (100 nM) (Fig. 5a(2),b(2)), resulting from the slight depolarization (3–4 mV). After about 40 s, the first phase was followed by the almost complete disappearance of spontaneous action potentials (Fig. 5a(3),b(3)). Steady-state voltage-clamp experiments performed at a holding potential of  $-50\text{mV}$  revealed that IR3535 (100 nM), in the presence of pirenzepine (100 nM), produced an inward current, corresponding to the current previously described (Fig. 3d), followed by the development of an outward current (Fig. 5c(3)). This outward current was strongly reduced in the presence of TEA-Cl (10 mM) or when the steady-state holding potential was hyperpolarized to  $-100\text{mV}$ , a value close to the calculated Nernstian equilibrium potential for potassium ions ( $-100.8\text{mV}$ ), in our experimental conditions (Fig. 5d(3)). In addition, bath application of IR3535 (100 nM) in the presence of pirenzepine (100 nM) was tested on the input membrane resistance under current-clamp in response to a hyperpolarizing current pulse (100 ms in duration; Fig. 5e,f). The input membrane resistance was increased by  $32.0 \pm 9.8\%$  ( $n = 7$ ) after IR3535 treatment (Fig. 5e(2)) and then was decreased by  $14.8 \pm 6.3\%$  ( $n = 6$ ) (Fig. 5f(3)). These results indicate that the development of both inward and outward currents, assumed to be carried by potassium ions through background channels, correlated well with i) the



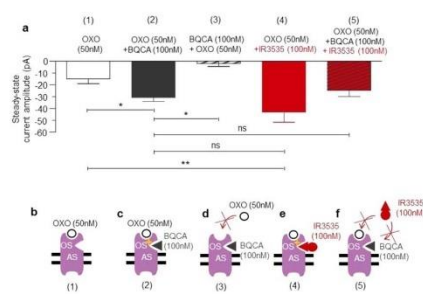


**Figure 7.** Computational docking results of ligands interactions at the allosteric site of M1 mACh receptor. The highest affinity poses of: IR3535 (red circle) (a) and BQCA (blue sticks in red circle) (b) located at the allosteric site of M1-mAChR. In panel (a,b) the pose of IR3535 at the orthosteric site is also displayed for clarity (below red circle). The mean value and standard deviation of binding energy has been calculated for each ligand based on the five runs. The energy of binding is:  $(-5.1 \pm 0.1)$  kcal/mol for IR3535 and  $(-8.5 \pm 0.1)$  kcal/mol for BQCA, respectively. (c) Close-up view of the highest affinity pose of IR3535 from the top view of M1-mAChR. Residues observed in the close vicinity of IR3535 are displayed in stick representation and coded by the color of transmembrane helices: TM1 - orange, TM2 - green, TM3 - dark blue, TM4 - yellow, TM5 - red, TM6 - magenta, TM7 - light blue. (d) Residues with the highest contribution to the energy of binding of IR3535 at the allosteric site of M1-mAChR.

IR3535-induced increase and decrease in the input membrane resistance, respectively and ii) the action potential discharge frequency increased followed by the disappearance of spontaneous action potentials (Fig. 5a–f). Interestingly, bath application of IR3535 (100 nM), in the presence of higher concentration of pirenzepine (i.e., 500 nM), only produced a slight hyperpolarization (2–3 mV) associated, within the first 30 s, with a strong reduction of action potential discharge frequency (Fig. 5g(3),h(3)). We never observed the first effect reported with lower concentration of pirenzepine (i.e., 100 nM). These results seem to indicate that high concentration of IR3535 (100 nM) was capable of displacing 100 nM pirenzepine, resulting in the dual effect as it is proposed in Fig. 5a,j. By contrast, increased concentration of pirenzepine (i.e., 500 nM) allowed to only reveal the second action of IR3535 (Fig. 5i). The experiments performed in the presence of pirenzepine (100 nM) unmasked an additional effect of IR3535 on M1-mAChR. One of the reason explaining why IR3535 (100 nM) elicited inward and outward potassium currents is that pirenzepine used at 100 nM could be displaced from the M1-mAChR orthosteric site by higher concentration of IR3535 (100 nM), depending on the time of application. This results in the generation of the inward potassium currents followed by the development of the outward current, which is consistent with a possible interaction of IR3535 with another M1-mAChR site, such as for instance an allosteric site. Pirenzepine used at higher concentration allows to only reveal the effect of IR3535 on a putative different site (Fig. 5i).

To check whether high concentration of IR3535 interacted with a completely different site than M1-AChR orthosteric site, experiments were performed in the presence of BQCA (100 nM), a highly selective allosteric modulator of the M1-mAChR<sup>33,34</sup> (Fig. 6a). If the allosteric modulator applied alone did not produce any agonist activity (Fig. 6a,c), pretreatment with BQCA prevented the action of 100 nM IR3535 (Fig. 6a,d). These last results strongly suggest that at high concentration IR3535 molecules could also bind to a different site than the M1-mAChR orthosteric site (Fig. 6b). To further support this idea, computational docking of IR3535 and BQCA interactions at the allosteric site of M1-mAChR receptor was performed realized. In Fig. 7a–c, the M1-mAChR allosteric site for IR3535 was displayed. The IR3535 ligand in the allosteric site was less buried than in the orthosteric one (Fig. 4a *versus* 7a), therefore the total contribution to the energy of binding coming from the allosteric site residues located within 6 Å distance to the ligand was smaller than before. A strong interaction involved a slightly smaller number of residues (Y104, Y106, Y381, W400) contributing substantially to the binding ( $SSF > -0.4$  kcal/mol) (Fig. 7d). The conformations of IR3535 docked to the allosteric site were compared to the highly selective allosteric modulator of the M1-mAChR, BQCA (Fig. 7b, blue sticks). The allosteric site best poses were similar for IR3535 and BQCA but the binding energy was significantly higher for BQCA. All together, these





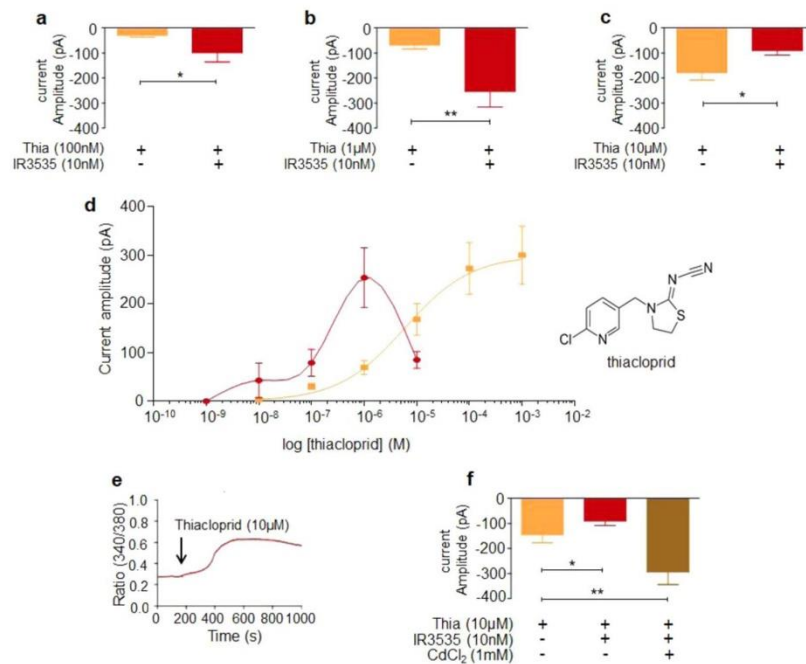
**Figure 8.** Allosteric site activation limits ligand effect with orthosteric site of M1-mAChR in DUM neurons. **(a)** Comparative histogram illustrating the inward current amplitude generated by the well known M1-mAChR agonist oxotremorine-M (OXO) and IR3535 recorded under voltage-clamp at a holding potential of  $-50\text{mV}$ . Number in brackets indicated above each bar represent the different experimental conditions. **(b-f)** Hypothetic models based on the results obtained in **(a)**. Number in brackets mentioned below each schemes correlates well with those indicated in **(a)**. Average data is shown as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3-11$ ); statistical test is Student unpaired t-test,  $**p < 0.01$ ;  $*p < 0.05$ ; ns, non significant.).

results indicate that IR3535, is able to mediate M1-mAChR activation in its own right by interacting to a recognition region in the M1-mAChR that is distinct from the primary, orthosteric site.

**Allosteric site stimulation modifies ligand interaction with orthosteric site of M1-mAChR in DUM neurons.** From the data presented just above, an important question still has to be answered regarding the development of the outward current only observed with high concentration of IR3535 (i. e.,  $100\text{ nM}$ ), which follows the early inward potassium current (Figs. 5c(3), 6a). Based on results illustrated in Figs. 6a,b,d and 7, interaction with M1-mAChR allosteric site may induce a conformational change of orthosteric site, limiting the effects of IR3535 (Fig. 6d). In other words, IR3535 used at high concentration could be also considered as an allosteric modulator of the function of the orthosteric agonist, revealing this unexpected outward current. Consequently, additional set of experiments were performed to understand better this non-classical allosteric mechanism (Fig. 8).

Under voltage-clamp at a holding potential of  $-50\text{mV}$ , application of oxotremorine-M ( $50\text{ nM}$ ), the M1-mAChR agonist, induced, as expected, an inward current reflecting the agonist effect on the orthosteric site, previously described (Figs. 3d,e, 8a,b). Then, experiments were performed with BQCA, the highly selective positive allosteric modulator for M1-mAChR (see also Fig. 7b). BQCA ( $100\text{ nM}$ ) potentiated the oxotremorine-M-induced inward current to nearly 200% of control (Fig. 8a,c). By contrast, when DUM neuron cell body was pretreated with BQCA ( $100\text{ nM}$ ), oxotremorine-M ( $50\text{ nM}$ ) was not able to produce any inward current (Fig. 8a,d). Similar experiments were performed with IR3535 ( $100\text{ nM}$ ). As shown in Fig. 8a,e, IR3535 also enhanced the inward current amplitude generated by oxotremorine-M ( $50\text{ nM}$ ) to nearly 290%. We next tested IR3535 ( $100\text{ nM}$ ) while maintaining M1-mAChR allosteric site activated by BQCA ( $100\text{ nM}$ ). In this condition, the oxotremorine-M-induced current amplitude was very similar to that of recorded with BQCA (Fig. 8a,c,f). We never observed any additional effect produced by IR3535 ( $100\text{ nM}$ ). These results confirm that IR3535 used at relatively high concentration might also be considered as a M1-mAChR allosteric modulator. The potentiating effect is only observed when the agonist is present. By contrast, the lack of effect of IR3535 ( $100\text{ nM}$ ) on orthosteric site after pretreatment with BQCA, suggests that interaction with M1-mAChR allosteric site may modify conformation of the orthosteric site limiting the effect of agonist (Fig. 6d).

**Synergistic interactions between IR3535 and the neonicotinoid insecticide, thiacloprid.** We then focused our study on the potential use of IR3535 as synergistic agent<sup>24</sup> to potentiate insecticide effect while reducing the concentration. It is known that DUM neuron display membrane potential properties regulated by the activation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Among insecticides acting on nAChRs, neonicotinoids are known to mimic the action of acetylcholine by targeting insect nAChRs<sup>35-37</sup>. We tested, under voltage-clamp, the effect of thiacloprid, a cyanoimine of the neonicotinoid class (Fig. 9d; inset), at a steady-state holding potential of  $-50\text{ mV}$ . Isolated DUM neurons were exposed to various concentrations of thiacloprid (Fig. 9a,b,c,d). Mean values of the thiacloprid-induced inward current amplitude were plotted against the logarithm of the non-cumulative concentration of thiacloprid (Fig. 9d). The sigmoid curve corresponded to the best fit through the mean data points (correlation coefficient  $r = 0.994$ ) according to the Hill Eq. (1). The  $EC_{50}$  value estimated for thiacloprid (the concentration of thiacloprid that produces 50% of the inward current amplitude) was  $5.8 \cdot 10^{-6}\text{ M}$  (Fig. 9d). In the presence of IR3535 ( $10\text{ nM}$ ), we observed a non-monotonic concentration-effect curve, shifted to the left (Fig. 9d) with the maximum steady-state inward current amplitude significantly increased from  $10^{-8}\text{ M}$  to  $10^{-6}\text{ M}$  compared to the current amplitude induced by thiacloprid alone (Fig. 9a,b,d). Interestingly, the inward current amplitude reached a maximum at  $10^{-6}\text{ M}$  before decreasing for higher concentrations of IR3535 than  $10^{-6}\text{ M}$  (Fig. 9c,d). The potentiation of the inward current amplitude induced by thiacloprid ( $100\text{ nM}$ ) in the presence of IR3535 ( $10\text{ nM}$ ) was abolished after pretreatment with pirenzepine ( $100\text{ nM}$ , not shown). We previously



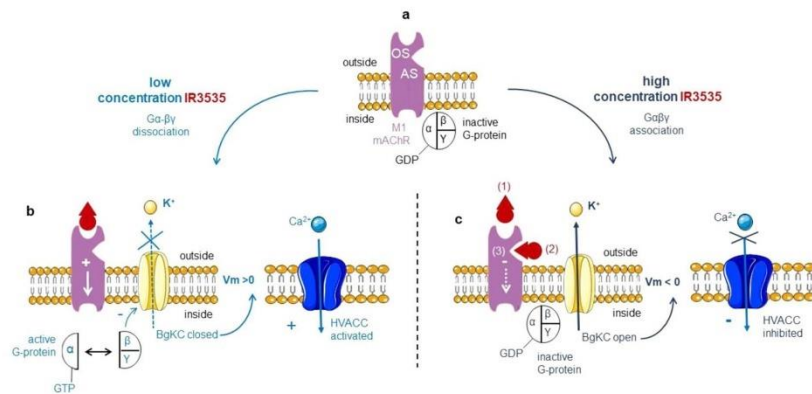
**Figure 9.** Low concentration concentration of IR3535, used as synergistic agent, increases the effect of thiacloprid, a neonicotinoid insecticide. (a,b,c) Histograms illustrating the concentration-dependent amplitudes of the thiacloprid-induced inward currents recorded under voltage-clamp conditions at a steady-state holding potential of  $-50$  mV, applied alone at  $100$  nM (a),  $1$   $\mu$ M (b) and  $10$   $\mu$ M (c) and after pretreatment with  $10$  nM IR3535. Note that IR3535 significantly potentiates the amplitude of the current produced by thiacloprid (a,b) whereas it is strongly decreased for high concentration of thiacloprid (c). Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4-7$ ), statistical test is Student unpaired t-test  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ . (d) Superimposed semi-logarithmic concentration-response curves for the inward current induced by thiacloprid applied alone and in the presence of  $10$  nM IR3535. Inset represents the chemical structure of the neonicotinoid insecticide, thiacloprid. (e) Bath application of  $10$   $\mu$ M thiacloprid increases intracellular calcium concentration in Fura-2 loaded DUM neuron cell body. (f) Histogram illustrating that  $\text{CdCl}_2$  ( $1$  mM), an inorganic calcium channel blocker counteracts the effect of IR3535 ( $10$  nM) applied in combination with high concentration of thiacloprid ( $10$   $\mu$ M). Data are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3-9$ ), statistical test is Student unpaired t-test,  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ .

reported that elevation of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  is now known to be the first step of molecular events involved for increasing the sensitivity to insecticides<sup>23,24,38</sup>. In this study, we revealed that IR3535 ( $10$  nM), elevating the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  via M1-mAChR orthosteric site activation (Figs. 1 and 2), potentiated the effect of thiacloprid but only at concentrations ranging from  $10^{-8}$  M to  $10^{-6}$  M (Fig. 9d). Because calcium influx through calcium channels regulates nAChR functions<sup>39,40</sup> and modulates the sensitivity of nAChRs to neonicotinoid insecticides<sup>23,35</sup>, the biphasic aspect of the concentration-response curve observed for high concentrations of thiacloprid suggests that an important increase in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  could reduce the sensitivity of nAChRs to thiacloprid. We therefore examined the effect of thiacloprid ( $10$   $\mu$ M) on  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Fig. 9e). Bath application of  $10$   $\mu$ M thiacloprid produced a marked elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , followed by a sustained elevated level. Parallel experiments performed with the calcium channel blocker  $\text{CdCl}_2$  ( $1$  mM) revealed an important increase in the steady-state inward current amplitude produced by thiacloprid ( $10$   $\mu$ M) in the presence of IR3535 ( $10$  nM; Fig. 9f).

## Discussion

Despite the numerous studies that have been carried out on the mode of action of insect repellents over the past decades<sup>41</sup>, much questions remain. Here we show that IR3535 displays complex effects on neuronal M1-mAChRs. Although M1-mAChR and more generally GPCRs are not considered as key targets used for insect control, some results begin to highlight the importance of these receptors as exciting elements in the development of novel strategies against insects<sup>42,43</sup>. In this context, insects M1/M3-mAChRs have already been reported to play fundamental role in the synergy between the repellent DEET and the carbamate insecticide, propoxur via calcium-dependent intracellular signalling pathways, extending efficacy of the treatment<sup>18</sup>. These results opened





**Figure 10.** Diagram representing the molecular events involved in the activation of M1 muscarinic acetylcholine receptor by IR3535. (a) IR3535, depending on the concentration tested, binds to distinct sites (M1-mAChR orthosteric and allosteric sites) that couple to the heterotrimeric G protein underlying the signal transduction that leads to IR3535-induced modulation of BgKC. (b) At low concentration, IR3535 interacts with M1-mAChR orthosteric site, which stimulation leads to trigger  $G\alpha\beta\gamma$  dissociation. The release of  $G\beta\gamma$  subunits inhibits background potassium current, resulting in membrane depolarization, which thereby activates high-voltage-activated calcium channels governing calcium influx. (c) At higher concentration, IR3535 induces dual effect on both M1-mAChR orthosteric and allosteric sites, depending on the time of exposure. Within the first seconds, IR3535 stimulates the orthosteric site (1) before interacting with the allosteric site (2). This last effect renders the G protein inactivated (3), which maintains the BgKC functional resulting in the hyperpolarized potential where high-voltage-activated calcium channels remain closed.  $V_m > 0$  and  $V_m < 0$  mean depolarization and hyperpolarization, respectively. M1-mAChR, M1 muscarinic acetylcholine receptor subtype; HVACC, high-voltage-activated calcium channels; BgKC, background potassium channels; OS and AS orthosteric and allosteric sites, respectively.

new fields of investigation regarding the importance of both mAChRs and the insect repellents, through an unexpected mode of action to control insects. They also emphasize that insect repellents such as IR3535 (this study) could not be used only as classical repellent but as a synergistic agent, which is an emerging concept to optimise insecticide treatment against insects<sup>24</sup>.

Except previous findings reporting that IR3535 affects the function of odorant receptors and gustatory sensitivity of insects<sup>20,44–46</sup>, the neurophysiological mechanism of IR3535 still remain to be investigated. Using a multidisciplinary approach, we have established that multiple mechanisms of action explain complex IR3535 activity in insect neurosecretory cells, *via* the interaction with the M1-mAChR (Fig. 10a). The IR3535-induced intracellular calcium rise is strongly correlated with interaction on M1-mAChR orthosteric site, an effect depending on the concentration of IR3535 tested. As summarized in Fig. 10b, low concentration of IR3535, (i.e. 10 nM) activates the orthosteric site resulting in the dissociation of heterotrimeric G protein into their component  $G\alpha$  and  $G\beta\gamma$  subunits. We have established an independent role in signaling for  $G\beta\gamma$  subunits distinct from  $G\alpha$  in the direct inhibition of the BgKC involved in the maintenance of the membrane potential of DUM neurons<sup>25,27</sup>. In this case,  $G\beta\gamma$  are considered as direct negative regulators of the potassium channels. The inhibiting effect of  $G\beta\gamma$  on the BgKC generates membrane depolarization, which activates HVA calcium channels and calcium influx. This atypical mechanism expands the physiological role of  $G\beta\gamma$  subunits already reported in cells<sup>28,47</sup>. One of the most interesting feature is the unexpected bell-shaped concentration-effect relationships of IR3535 observed for the very low concentration range (i.e., between 1 nM and 100 nM). Unlike standard sigmoidal curves, bell-shaped concentration-response curve suggests more complex biological effects such as, for instance, multiple-binding sites. IR3535 increases intracellular calcium level at low concentration (10 nM) but inhibits calcium rise at higher concentrations (100 nM). In this last case, the inhibition of the elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  may be explained by the hypothetical model illustrated in Fig. 10c. During the period of time of the treatment by 100 nM IR3535, the dual effect observed involves two different sites. At the beginning of the treatment, the effect of IR3535 on the M1-mAChR orthosteric site generates the early inward potassium current (Fig. 10c(1)). Then after, IR3535 interacts with an allosteric site, distinct from the orthosteric binding site, that leads to BgKC activation and membrane hyperpolarization (Fig. 10c(2)). Interestingly, in the presence of oxotremorine-M, IR3535 (100 nM) increases the activity of the agonist, like the positive allosteric modulator BQCA. However, this effect disappears as exposure time increases, revealing the second action described just above. This last pharmacological action contrasts with the classical allosteric mechanisms<sup>48,49</sup>. It seems that this interaction allosterically influences the ligand binding on the orthosteric site, which in turn decreases the effect of IR3535. In this case the partial agonist effect of IR3535 stabilizes the receptor in its active conformation less effectively, which do not engage conformational changes leading to the dissociation between  $G\alpha$  and  $G\beta\gamma$  subunits. The G protein heterotrimers remain intact, keeping

the BgKC open governing membrane hyperpolarization and inhibition of calcium influx (Fig. 10c(3)). This is confirmed by the experiments illustrated in Supplementary Fig 2 indicating that IR3535 (100 nM) never produces significant outward potassium current when the experiments were performed with GTP- $\gamma$ -S, a non-hydrolyzable G-protein-activating analog of GTP maintaining G protein activation. Based on these results, IR3535 is believed to produce either inhibition or activation of BgKC through modulation of M1-mAChRs. Depending on the concentration tested, IR3535 produces distinct effect manifested as a switch from inhibition to activation of potassium channels. This mechanism appears to involve a cross-talk between allosteric and orthosteric sites of the active receptor conformation explaining both the increase and the decrease in the action potential discharge frequency observed during time of IR3535 exposure (see Fig. 5a,b). Although M1-mAChRs are targeted by IR3535, the effects reported in this study vary somewhat from those characterized with another repellent, DEET<sup>18</sup>. The maximum intracellular calcium rise observed is reached at a concentration 10-fold lower than with DEET and the intracellular signalling pathways following the interaction of IR3535 with M1-mAChRs differ from those previously described with DEET in the same neuronal preparation. This reinforced the importance of obtaining deeper knowledges on the multifaceted effects of repellent in insects.

As previously stated, the aim of this study is also to envisage the use of IR3535 at low concentration as synergistic agent to optimize insecticide efficacy. It is now accepted that calcium-dependent intracellular regulation (i.e. phosphorylation/dephosphorylation process) increases plasma membrane receptors and/or ion channels sensitivity to insecticides<sup>18,23,50</sup>. In this context, the use of repellent and insecticide co-formulated mixtures is a topic of great interest currently, particularly in the integrated vector management (IVM)<sup>18,24,51–53</sup>. Here, we report the development of an innovative vector control strategy using IR3535. However, the level of the intracellular calcium rise must be kept within a strictly controlled range to avoid opposite effects. Because of their crucial role in triggering rapid neural transmission, nAChRs are the primary target site of a broad range of insecticides including neonicotinoids<sup>36,37,54,55</sup>. We have demonstrated in this study that only low concentration of IR3535 (10 nM) increases nAChR sensitivity to the neonicotinoid insecticide thiacloprid *via* the internal calcium rise. The significant shift of the sigmoid curve towards lower insecticide concentrations associated with an increase of the thiacloprid effect confirm the important role of the synergistic agent (IR3535) in the optimization of the insecticide action, obtained at lower concentration, when compared to the effect of the insecticide applied alone. However, as indicated above, the synergism observed is very dependent on the  $[Ca^{2+}]_i$  elevation. We have shown that relatively high concentration of thiacloprid, applied alone, also increases  $[Ca^{2+}]_i$ . IR3535 combined with high concentration of thiacloprid results in a strong decrease of nAChR sensitivity to this insecticide. This opposite effect reflects the important role of calcium allosteric modulation involved in the regulation of insect pharmacological nAChR activity. Furthermore, we also reveal that relatively high concentration of IR3535 (i.e., 100 nM) through its interaction with the M1-mAChR allosteric site, is not able to produce any intracellular calcium rise, a key element in the synergism between IR3535 and thiacloprid. This confirms that it was essential to characterize precisely the mode of action of IR3535 before its use as a synergistic agent. The synergism observed is only possible in the narrow low concentration range. IR3535 is nevertheless able to trigger intracellular calcium rise, thereby activating a calcium-dependent signalling involved in the optimization of the nAChR sensitivity to thiacloprid.

In conclusion, the synergistic interaction between IR3535 and thiacloprid contributes to significantly increase the efficacy of the treatment while reducing concentrations. This is particularly in line with the recommended safe use of phytosanitary compounds in IVM.

## Methods

All experiments were performed on adult male cockroaches *Periplaneta americana* taken from our laboratory stock colony, maintained under standard conditions (29 °C, photo-cycle 12 h light/12 h dark).

**Cell preparation.** Experiments were carried out on DUM neuron somata isolated from the midline of the terminal abdominal ganglion (TAG) of the nerve chord of adult male cockroaches (*Periplaneta americana*) as already described<sup>56</sup>. Animals were immobilized ventral side up on a dissection dish. The ventral cuticle and the accessory gland were removed to allow access to the TAG, which was carefully dissected under a binocular microscope and placed in normal cockroach saline containing (in mM): 200 NaCl, 3.1 KCl, 5 CaCl<sub>2</sub>, 4 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, and 50 sucrose, pH was adjusted to 7.4 with NaOH. Isolation of adult DUM neuron somata was performed under sterile conditions by using enzymatic digestion by collagenase (type IA, 280 IU/ml; Worthington Biochemicals, Freehold, NJ) at 29 °C for 35 min. Then, a mechanical dissociation through fire-polished Pasteur pipettes was used to isolate DUM neurons from the TAG<sup>55</sup>. DUM neuron somata were maintained at 29 °C for 24 h before electrophysiological experiments were carried out.

**Calcium imaging.** DUM neuron cell bodies were isolated from the Terminal Abdominal Ganglion (TAG), as already mentioned above. The cells were washed two times in saline and incubated in the dark with 5 mM Fura-2 pentakis (acetoxymethyl) ester (Fura-2 AM) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in the presence of 0.1% pluronic acid F68 (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for 1 h at 37 °C. Pluronic acid is a nonionic surfactant used as a stabilizer of cell membrane protecting from membrane shearing to facilitate uptake of Fura-2 AM. After loading, cells were washed two times in saline. The glass coverslips were then mounted in a recording chamber (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) connected to a gravity perfusion system allowing drug application. Imaging experiments were performed with an inverted Nikon Eclipse Ti microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with epifluorescence. Excitation light was provided by a 75-W integral xenon lamp. Excitation wavelengths (340 nm and 380 nm) were applied using a Lambda DG4 wavelength switcher (Sutter instrument, Novato, CA, USA). Images were collected with an Orca-R2 CCD camera (Hamamatsu photonics, Shizuoka, Japan) and recorded on the computer with Imaging Workbench software (version 6, Indec BioSystems,



Santa Clara, CA, USA). Experiments were carried out at room temperature. Intracellular calcium level was expressed as the ratio of emitted fluorescence (340/380 nm), as previously reported<sup>57</sup>.

**Electrophysiology and data analysis.** The patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration was used to record spontaneous action potentials and input membrane resistances (current-clamp mode) and steady-state ionic currents (voltage-clamp mode)<sup>35,56–58</sup>. Signals were recorded with an Axopatch 200 A patch-clamp amplifier (Axon instruments), digitized and acquired using a MiniDigidata 1440 analog-digital converter (Axon Instruments). Currents were treated with axo-scope 10.2 software (Axon Instruments). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC 150T-10; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus Edenbridge, UK) using a P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument Company, Novato, U.S.A). Pipettes had resistances ranging from 1 to 1.5 MΩ when filled with internal pipette solution (see composition below). The liquid junction potential between bath and internal solutions was always corrected before the formation of a gigaohm seal (>1 GΩ). Steady-state ionic currents induced by IR3535 and thiacloprid were recorded with software control pClamp (version 10.1; Axon instruments) and were low-pass filtered at 10 kHz with clampfit software (version 10.1; Axon instruments). Experiments were carried out at 20 °C.

We performed data analysis including fitting procedures, by using the software Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). To estimate the EC<sub>50</sub> value of the curve fitting, data were analyzed with the GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The Hill equation used to fit the sigmoid curve was:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope})}) \quad (1)$$

where Top and Bottom are plateaux in the units of the Y axis, EC<sub>50</sub> is the concentration that gives halfway between Bottom and Top. HillSlope describes the steepness of the curve.

For statistical analysis, data are presented as the mean ± S.E.M. Information regarding which pairs of means were significantly different and which were not was determined by Student's *t* test for multiple comparisons. In this case, statistical analysis was expressed as nonsignificant for *p* > 0.05 and significant for \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, and \*\*\**p* < 0.001.

**Solution and drug applications.** Bath solution superfusing the cells contained (in mM): 200 NaCl, 3.1 KCl, 5 CaCl<sub>2</sub>, 4 MgCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES; pH was adjusted to 7.4 with NaOH<sup>35</sup>. Patch pipettes were filled with solution containing (in mM): 160 K/Dgluconate, 10 KF, 10 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 ATP, 0.1 cAMP, 10 EGTA, and 10 HEPES; pH was adjusted to 7.4 with KOH. Thiacloprid stock solutions (1 M) and BQCA, IR3535 and gallein stock solutions (10<sup>-2</sup>M) were prepared in DMSO and then diluted in the bath solution to obtain the different concentrations tested. The highest concentration used in the electrophysiological recordings of DMSO was 0.1%. This concentration of solvent was not found to have any effect on the electrophysiological properties of DUM neuron cell body. Pharmacological agents were applied by a gravity perfusion valve controller system (VC-6M, Harvard apparatus, 1 s in duration) controlled by pClamp software (flow rate of perfusion: 0.5 ml/min). The perfusion tube was placed within 100 μm from the isolated neuron cell body. IR3535, BQCA, cadmium chloride, ω-conotoxin GVIA from *Conus geographus*, caffeine, TBM-8, pirenzepine, U73122 and TEA-Cl were added to the external solution. GDP-β-S was added in the internal pipette solution immediately before use. All compounds were purchased from Sigma Chemicals (L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Except gallein from R&D Systems-Bio-technie, (Lille, France), [D-Trp7,9,10]-substance P from Tocris Bioscience, (Bristol, UK) and IR3535 from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

**Molecular in silico docking.** The molecular docking of ligands: IR3535, pirenzepine, oxotremorine-M and BQCA into a crystal structure (PDB code: 5cxv) of the excitatory ganglionic muscarinic acetylcholine receptor (M1-mAChR) was performed using SMINA<sup>59</sup> package. The human M1 receptor structure was used for docking without modifications. The default SMINA scoring function (SSF) is derived from AutoDock Vina<sup>60</sup> and includes three steric terms, a hydrogen bond term, a hydrophobic term, and a torsion count factor. Rigid docking was carried out with SMINA default settings; a grid of 38 × 32 × 44 Å<sup>3</sup> size centered at 10 Å distance from the channel surface was used. The following protocol, called a "multiple molecular docking" (MMD), has been developed previously<sup>61</sup> and used here to identify the preferred binding sites of a ligand in the M1 receptor: (i) For each ligand 5 independent SMINA docking runs were performed and the pose with the lowest SSF, i.e. having the highest affinity to M1-mAChR, was selected in each run. (ii) In the next step, the SMINA docking was performed again, but for the M1 receptor having this best pose occupied by the ligand. (iii) Again, the second best pose was determined using the procedure no. (iv) This cycle has been repeated until 10 best affinity binding poses were determined. (v) The MMD procedure was applied for all four ligands which resulted in 200 independent SMINA docking runs. The analysis and visualizations were made using the VMD code<sup>62</sup> and home-made scripts in the ProDy<sup>63</sup> package. The OS cavity volume was calculated using POCASA 1.1 server<sup>32</sup>.

Received: 21 November 2019; Accepted: 8 April 2020;

Published online: 22 April 2020

## References

- Norris, E. J. & Coats, J. R. Current and Future Repellent Technologies: The Potential of Spatial Repellents and Their Place in Mosquito-Borne Disease Control. *Int J Environ Res Public Health* **14** (2017).
- Schorderet-Weber, S., Noack, S., Selzer, P. M. & Kaminsky, R. Blocking transmission of vector-borne diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **7**, 90–109 (2017).
- Tavares, M. *et al.* Trends in insect repellent formulations: A review. *Int J Pharm* **539**, 190–209 (2018).

4. Sparks, J. T. & Dickens, J. C. Mini review: Gustatory reception of chemicals affecting host feeding in aedine mosquitoes. *Pestic Biochem Physiol* **142**, 15–20 (2017).
5. Sparks, J. T. *et al.* Membrane Proteins Mediating Reception and Transduction in Chemosensory Neurons in Mosquitoes. *Front Physiol* **9**, 1309 (2018).
6. Kaupp, U. B. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 188–200 (2010).
7. Leal, W. S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 373–391 (2013).
8. DeGennaro, M. *et al.* orco mutant mosquitoes lose strong preference for humans and are not repelled by volatile DEET. *Nature* **498**, 487–491 (2013).
9. Ditzgen, M., Pellegrino, M. & Vossahl, L. B. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science* **319**, 1838–1842 (2008).
10. Kwon, J. Y., Dahanukar, A., Weiss, L. A. & Carlson, J. R. Molecular and Cellular Organization of the Taste System in the Drosophila Larva. *Journal of Neuroscience* **31**, 15300–15309 (2011).
11. Lupi, E., Hatz, C. & Schlagenhauf, P. The efficacy of repellents against Aedes, Anopheles, Culex and Ixodes spp. - a literature review. *Travel Med Infect Dis* **11**, 374–411 (2013).
12. Pellegrino, M., Steinbach, N., Stensmyr, M. C., Hansson, B. S. & Vossahl, L. B. A natural polymorphism alters odour and DEET sensitivity in an insect odorant receptor. *Nature* **478**, 511–514 (2011).
13. Pitts, R. J., Derryberry, S. L., Zhang, Z. & Zwiebel, L. J. Variant Ionotropic Receptors in the Malaria Vector Mosquito Anopheles gambiae Tuned to Amines and Carboxylic Acids. *Sci Rep* **7**, 40297 (2017).
14. Stanczyk, N. M., Brookfield, J. F. Y., Ignell, R., Logan, J. G. & Field, L. M. Behavioral insensitivity to DEET in Aedes aegypti is a genetically determined trait residing in changes in sensillum function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 8575–8580 (2010).
15. Syed, Z. & Leal, W. S. Mosquitoes smell and avoid the insect repellent DEET. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 13598–13603 (2008).
16. Wicher, D. Tuning Insect Odorant Receptors. *Front Cell Neurosci* **12**, 94 (2018).
17. Corbel, V. *et al.* Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biol.* **7**, 47 (2009).
18. Abd-Ella, A. *et al.* The Repellent DEET Potentiates Carbamate Effects via Insect Muscarinic Receptor Interactions: An Alternative Strategy to Control Insect Vector-Borne Diseases. *PLoS ONE* **10**, e0126406 (2015).
19. DeGennaro, M. The mysterious multi-modal repellency of DEET. *Fly (Austin)* **9**, 45–51 (2015).
20. Sanford, J. L., Barski, S. A., Seen, C. M., Dickens, J. C. & Shields, V. D. C. Neurophysiological and behavioral responses of gypsy moth larvae to insect repellents: DEET, IR3535, and picaridin. *PLoS ONE* **9**, e99924 (2014).
21. Swale, D. R., Sun, B., Tong, F. & Bloomquist, J. R. Neurotoxicity and mode of action of N, N-diethyl-meta-toluamide (DEET). *PLoS ONE* **9**, e103713 (2014).
22. Legeay, S., Clere, N., Apaire-Marchais, V., Faure, S. & Lapied, B. Unusual modes of action of the repellent DEET in insects highlight some human side effects. *Eur. J. Pharmacol.* **825**, 92–98 (2018).
23. Raymond, V., Goven, D., Benzidane, Y., List, O. & Lapied, B. Influence of Cellular and Molecular Factors on Membrane Target Sensitivity to Insecticides. *Curr. Med. Chem.* **24**, 2974–2987 (2017).
24. Deshayes, C. *et al.* Synergistic agent and intracellular calcium, a successful partnership in the optimization of insecticide efficacy. *Curr Opin Insect Sci* **30**, 52–58 (2018).
25. Wicher, D., Walther, C. & Wicher, C. Non-synaptic ion channels in insects—basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog. Neurobiol.* **64**, 431–525 (2001).
26. Grolleau, F. *et al.* Indirect activation of neuronal noncapacitative Ca<sup>2+</sup> entry is the final step involved in the neurotoxic effect of Tityus serrulatus scorpion beta-toxin. *Eur. J. Neurosci.* **23**, 1465–1478 (2006).
27. Grolleau, F. & Lapied, B. Dorsal unpaired median neurons in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J. Exp. Biol.* **203**, 1633–1648 (2000).
28. Khan, S. M. *et al.* The expanding roles of G $\beta\gamma$  subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol. Rev.* **65**, 545–577 (2013).
29. Lehmann, D. M., Seneviratne, A. M. P. B. & Smrcka, A. V. Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation. *Mol. Pharmacol.* **73**, 410–418 (2008).
30. Belkouch, M. *et al.* The chemokine CCL2 increases Nav1.8 sodium channel activity in primary sensory neurons through a G $\beta\gamma$ -dependent mechanism. *J. Neurosci.* **31**, 18381–18390 (2011).
31. Li, Z. *et al.* The inhibition of high-voltage-activated calcium current by activation of MrgC11 involves phospholipase C-dependent mechanisms. *Neuroscience* **300**, 393–403 (2015).
32. Yu, J., Zhou, Y., Tanaka, I. & Yao, M. Roll: a new algorithm for the detection of protein pockets and cavities with a rolling probe sphere. *Bioinformatics* **26**, 46–52 (2010).
33. Ma, L. *et al.* Selective activation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 15950–15955 (2009).
34. Abdul-Ridha, A. *et al.* Mechanistic insights into allosteric structure-function relationships at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **289**, 33701–33711 (2014).
35. Bodereau-Dubois, B. *et al.* Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**, 326–339 (2012).
36. Ihara, M., Buckingham, S. D., Matsuda, K. & Sattelle, D. B. Modes of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr. Med. Chem.* **24**, 2925–2934 (2017).
37. Casida, J. E. Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators: Progress and Prospects. *Annu. Rev. Entomol.* **63**, 125–144 (2018).
38. Apaire-Marchais, V. *et al.* Virus and calcium: an unexpected tandem to optimize insecticide efficacy. *Environ Microbiol Rep* **8**, 168–178 (2016).
39. Thany, S. H., Courjaret, R. & Lapied, B. Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical alpha-bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neurosci. Lett.* **438**, 317–321 (2008).
40. Calas-List, D., List, O. & Thany, S. H. Nicotine application on cockroach dorsal unpaired median neurons induces two distinct ionic currents: implications of different nicotinic acetylcholine receptors. *Neurosci. Lett.* **518**, 64–68 (2012).
41. Islam, J., Zaman, K., Duarah, S., Raju, P. S. & Chattopadhyay, P. Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries. *Acla Trop.* **167**, 216–230 (2017).
42. Sharan, S. & Hill, C. A. Potential of GPCR-Targeting Insecticides for Control of Arthropod Vectors. in ACS Symposium Series (eds. Gross, A. D., Ozoe, Y. & Coats, J. R.) vol. 1265 55–84 (American Chemical Society, 2017).
43. Gross, A. D. & Bloomquist, J. R. Characterizing Permethrin and Etofenprox Resistance in Two Common Laboratory Strains of Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae). *Insects* **9**, (2018).
44. Bohbot, J. D. *et al.* Multiple activities of insect repellents on odorant receptors in mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.* **25**, 436–444 (2011).
45. Bohbot, J. D. & Dickens, J. C. Odorant receptor modulation: Ternary paradigm for mode of action of insect repellents. *Neuropharmacology* **62**, 2086–2095 (2012).



46. Sparks, J. T. & Dickens, J. C. Electrophysiological Responses of Gustatory Receptor Neurons on the Labella of the Common Malaria Mosquito, *Anopheles quadrimaculatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* <https://doi.org/10.1093/jme/tjw073> (2016).
47. Inanobe, A. & Kurachi, Y. Membrane channels as integrators of G-protein-mediated signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**, 521–531 (2014).
48. Schwartz, T. W. & Holst, B. Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 366–373 (2007).
49. Weis, W. I. & Kobilka, B. K. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 897–919 (2018).
50. Pitti Caballero, J. *et al.* Nanoencapsulated deltamethrin as synergistic agent potentiates insecticide effect of indoxacarb through an unusual neuronal calcium-dependent mechanism. *Pestic Biochem Physiol* **157**, 1–12. Patent number 10492491 (2019).
51. Lees, R. *et al.* A testing cascade to identify repurposed insecticides for next-generation vector control tools: screening a panel of chemistries with novel modes of action against a malaria vector. *Gates Open Res* **3**, 1464. Patent number 10390532 (2019).
52. Goulu, M., Apaire-Marchais, V., List, O., Raymond, V. & Lapiéd, B. Insecticide composition including a synergistic agent. Patent number 10492491 (2019).
53. Goulu, M., Apaire-Marchais, V., List, O., Raymond, V. & Lapiéd, B. Insecticide composition including thiamethoxam and a synergistic agent. Patent number 10390532 (2019).
54. Ihara, M. & Matsuda, K. Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact on pollinators. *Curr Opin Insect Sci* **30**, 86–92 (2018).
55. Taillebois, E., Cartereau, A., Jones, A. K. & Thany, S. H. Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pestic Biochem Physiol* **151**, 59–66 (2018).
56. Lapiéd, B., Malécot, C. O. & Pelhate, M. Patch-clamp Study of the Properties of the Sodium Current in Cockroach Single Isolated Adult Aminergic Neurons. *JEB* **151**, 387–403 (1989).
57. Courjaret, R., Grolleau, F. & Lapiéd, B. Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an alpha-bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur. J. Neurosci.* **17**, 2023–2034 (2003).
58. Courjaret, R. & Lapiéd, B. Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol. Pharmacol.* **60**, 80–91 (2001).
59. Koes, D. R., Baumgartner, M. P. & Camacho, C. J. Lessons Learned in Empirical Scoring with smina from the CSAR 2011 Benchmarking Exercise. *J. Chem. Inf. Model.* **53**, 1893–1904 (2013).
60. Trott, O. & Olson, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461 (2010).
61. Wenzel, S. E. *et al.* PEBP1 Wardens Ferroptosis by Enabling Lipoygenase Generation of Lipid Death Signals. *Cell* **171**, 628–641.e26 (2017).
62. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**(33–38), 27–28 (1996).
63. Bakan, A. *et al.* Evol and ProDy for bridging protein sequence evolution and structural dynamics. *Bioinformatics* **30**, 2681–2683 (2014).

### Acknowledgements

M.G. and S.P. were supported by a doctoral fellowship of the Direction Générale de l'Armement (Ministère des Armées)/Région Pays de la Loire (France). W.N. acknowledges partial support from National Science Centre, Poland (grant 2016/23/B/ST4/01770). The computational results used in this review were obtained using Interdisciplinary Centre for Modern Technologies facilities, NCU, Torun, Poland.

### Author contributions

E.M., K.M.R., M.G., C.D., M.S., S.P., W.N., V.A.M. and B.L. contributed to the collection and analysis of the data. W.N. and K.M.R. designed and performed molecular *in silico* docking. B.L. conceived and coordinated the study. K.M.R., W.N. and B.L. wrote the paper. All authors read and edited the paper.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63957-x>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to B.L.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

## Annexe 2

# communications biology

ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s42003-021-02192-0>

OPEN

## Compensatory mechanisms in resistant *Anopheles gambiae* AcerKis and KdrKis neurons modulate insecticide-based mosquito control

Stéphane Perrier<sup>1</sup>, Eléonore Moreau<sup>1</sup>, Caroline Deshayes<sup>1</sup>, Marine El-Adouzi<sup>1</sup>, Delphine Goven<sup>1</sup>, Fabrice Chandre<sup>2</sup> & Bruno Lapied<sup>1✉</sup>

In the malaria vector *Anopheles gambiae*, two point mutations in the acetylcholinesterase (*ace-1<sup>R</sup>*) and the sodium channel (*kdr<sup>R</sup>*) genes confer resistance to organophosphate/carbamate and pyrethroid insecticides, respectively. The mechanisms of compensation that recover the functional alterations associated with these mutations and their role in the modulation of insecticide efficacy are unknown. Using multidisciplinary approaches adapted to neurons isolated from resistant *Anopheles gambiae* AcerKis and KdrKis strains together with larval bioassays, we demonstrate that nAChRs, and the intracellular calcium concentration represent the key components of an adaptation strategy ensuring neuronal functions maintenance. In AcerKis neurons, the increased effect of acetylcholine related to the reduced acetylcholinesterase activity is compensated by expressing higher density of nAChRs permeable to calcium. In KdrKis neurons, changes in the biophysical properties of the L1014F mutant sodium channel, leading to enhance overlap between activation and inactivation relationships, diminish the resting membrane potential and reduce the fraction of calcium channels available involved in acetylcholine release. Together with the lower intracellular basal calcium concentration observed, these factors increase nAChRs sensitivity to maintain the effect of low concentration of acetylcholine. These results explain the opposite effects of the insecticide clothianidin observed in AcerKis and KdrKis neurons in vitro and in vivo.

<sup>1</sup>Univ Angers, INRAE, SIFCIR, SFR QUASAV, Angers, France. <sup>2</sup>MIVEGEC, UMR IRD 224-CNRS 5290-Université de Montpellier, 911 avenue Agropolis, Montpellier, Cedex 05, France. ✉email: [bruno.lapied@univ-angers.fr](mailto:bruno.lapied@univ-angers.fr)



Vector-borne diseases account for an important number of human illnesses. They represent 17% of the global infectious diseases, causing almost one million deaths each year<sup>1</sup>. Based on the sixth Global Fund replenishment conference held in 2019, malaria is one of the three most dangerous infectious disease worldwide. It accounts for a total of about 405,000 deaths and 228 million contamination cases each year, putting half of the world's population at risk in either Africa, South-East Asia, Eastern Mediterranean, Western Pacific or Americas<sup>2</sup>. Mosquitoes belonging to *Anopheles gambiae* s.l. complex of species are major vectors of malaria in sub Saharan Africa. Prevention of malaria transmission is largely implemented by the use of insecticide-treated bed nets (ITNs) and/or the development of strategies in insecticide-based mosquito control to prevent mosquito biting at the individual and household levels. In this context, insecticides are one of the important arsenals in the fight against mosquito vectors of malaria to save hundreds of millions of lives<sup>3</sup>. However, the development of insecticide resistance in vector mosquitoes, may cause control failure, allowing a resurgence of malaria in endemic countries<sup>4</sup>.

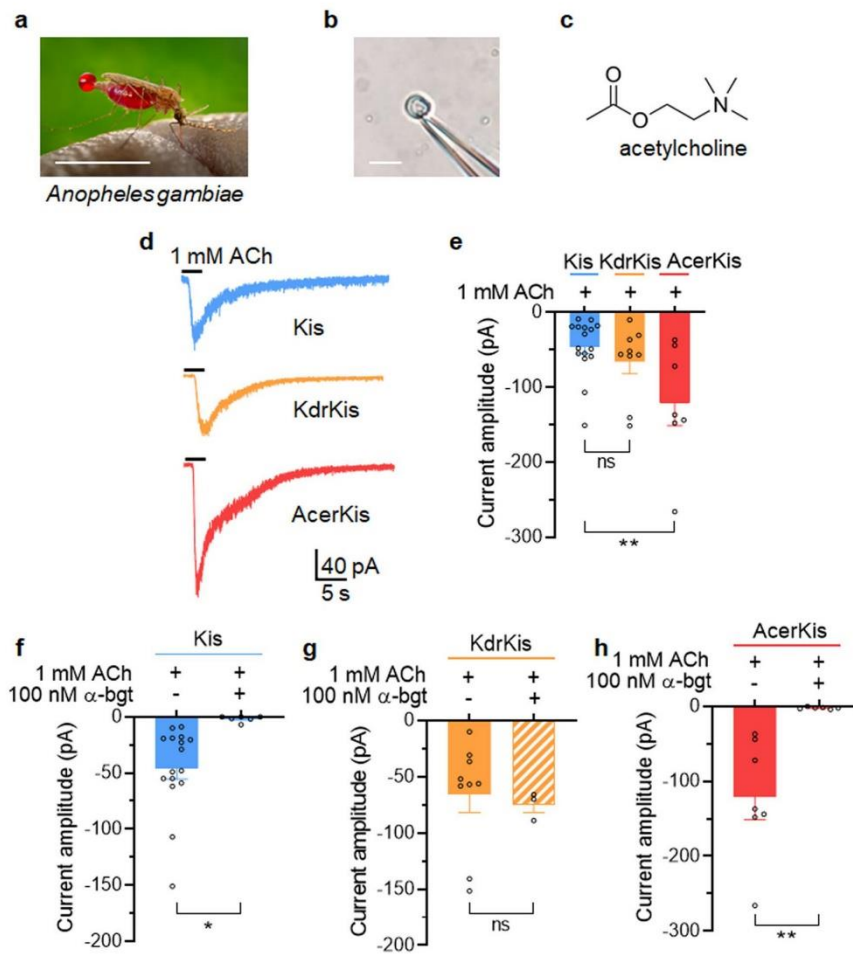
Effective insecticide resistance management (IRM) is difficult and detecting resistance before it becomes an operational problem is a complex challenge. Insecticide resistance is a rapid adaptive response of mosquito populations due to many selection pressures exerted by human activities in mosquitoes. Multiple resistance mechanisms occurring in mosquitoes are an inherited characteristic involving several physiological and/or behavioral changes. Among classical examples of resistance mechanisms, an over-expression of several enzyme families such as cytochromes P450, esterases and glutathione-S-transferases is well described<sup>4–7</sup>. In addition, mosquitoes acquire target site insensitivity through mutations (e.g., *kdr*, *super-kdr*, *rdl*, *ace-1<sup>R</sup>*) within structural genes that reduce the binding of the insecticide<sup>4,5,7–10</sup>. The reduced penetration of insecticides is also another process now considered as a resistance mechanism in mosquitoes<sup>4,11,12</sup>. Furthermore, insecticide resistance mechanisms can also be referred as behavioral changes in response to insecticide exposure allowing mosquitoes to overcome management tactics<sup>4,13–17</sup>. Today, new additional insecticide resistance mechanisms involving the implication of unsuspected proteins identified in *Anopheles gambiae* also contribute to the resistance phenotype<sup>7,18–21</sup>. Using a meta-analysis approach of transcriptomic data from *Anopheles gambiae* populations resistant to the commonly used pyrethroid insecticides, novel multiple up-regulated gene families coding for insecticide-binding proteins have been characterized. This includes members of hexamerins and/or  $\alpha$ -crystallins<sup>22</sup>, up-regulated in response to deltamethrin exposure that reduce mosquito mortality following deltamethrin treatment<sup>20</sup>. A whole-genome microarray approach indicates that overexpression of genes encoding salivary gland proteins can be closely associated with insecticide resistance in *Anopheles gambiae*<sup>19</sup>. Another mechanism recently identified, involves mosquito sensory appendage protein, (e.g., SAP2), a member of chemosensory protein family known to be implicated in the transport of hydrophobic compounds<sup>23</sup>. They participate in the development of pyrethroid resistance through the binding of insecticides at the first point of mosquito contact with bed nets<sup>21</sup>.

The outcomes of these studies highlight the complexity of mechanisms involved in insecticide resistance. They also point out a research area that has never been investigated. It concerns the characterization of unsuspected physiological cellular and/or molecular events, which emerge as the consequences of the resistance mechanisms. These events, acting as compensatory mechanisms to strengthen physiological functions, may undoubtedly impact the effectiveness of the IRM strategies.

To the best of our knowledge, in this study we investigate in mosquitoes the neuronal compensatory mechanisms following the development of resistance-associated point mutations in the voltage-gated sodium channels<sup>5,24</sup> and AChE1<sup>25,26</sup> genes characterized in two strains of *Anopheles gambiae* resistant to two distinct classes of insecticides, the pyrethroid/DDT-resistant strain, named KdrKis (*kdr<sup>R</sup>*, L1014F) and the organophosphate/carbamate-resistant strain, named AcerKis (*ace-1<sup>R</sup>*, G119S). We use multidisciplinary approaches adapted to isolated *Anopheles gambiae* neurons<sup>27</sup> to characterize changes in the expression and pharmacological profile of neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) following the mutations G119S in AcerKis strain and L1014F in KdrKis strain compared to the susceptible laboratory reference *Anopheles gambiae* Kis strain. Parallel bioassays have also been conducted on AcerKis and KdrKis larvae to establish correlation between *in vivo* and *in vitro* studies. Firstly, we report that higher nAChRs density associated with reduced activity of AChE1 (a key enzyme in the nervous system, which terminates nerve impulses by catalysing the hydrolysis of neurotransmitter acetylcholine) is linked to the mutation G119S in neurons from AcerKis strain. Secondly, the modification of biophysical properties of the voltage-gated sodium channel (known to play an essential role in the initiation and propagation of action potentials in neurons) and studied for the first time in neurons from KdrKis strain, impacts nAChRs sensitivity to acetylcholine. Thirdly, we indicate that these unexpected compensatory physiological mechanisms, which both affect the cholinergic system, can modify nAChRs sensitivity to the recommended insecticide clothianidin, *in vitro* and *in vivo*. Our results demonstrate that highly complex compensatory mechanisms related to point mutations are essential to be understood for the development of insecticide-based strategies used for mosquito control.

## Results

**Effect of acetylcholine on isolated neurons from *Anopheles gambiae* Kis, AcerKis and KdrKis strains.** Whole-cell patch clamp technique, adapted on isolated neurons<sup>27</sup> from *Anopheles gambiae* (Fig. 1a, b), was used to study the electrophysiological properties of the ACh-induced inward currents (Fig. 1c) mediated by nAChRs, in the presence of 100 nM atropine to block muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs). Under steady-state voltage-clamp condition (holding potential of  $-50$  mV), pulse application of ACh (1 mM, 3 s in duration) onto the soma of isolated neuron cell bodies from Kis, KdrKis and AcerKis strains, induced transient inward currents which vary in amplitude (Fig. 1d). As illustrated in Fig. 1e, the mean current amplitudes were  $-45.8 \pm 9.5$  pA ( $n = 16$ ),  $-65.8 \pm 16.8$  pA ( $n = 10$ ) and  $-121.1 \pm 30$  pA ( $n = 7$ ) for Kis, KdrKis and AcerKis neurons, respectively. Although current amplitudes appeared to be statistically non-significant between Kis and KdrKis neurons, peak current amplitudes were on average  $\sim 2.5$  larger in AcerKis than in Kis neurons. Bath application of the nAChR antagonist  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -bgt, 100 nM) completely inhibited the inward current induced by 1 mM ACh in both Kis and AcerKis neurons ( $n = 4–6$ ). Interestingly,  $\alpha$ -bgt did not produce any effect on ACh current amplitude in KdrKis neurons (Fig. 1f, g, h). Such inability of  $\alpha$ -bgt to bind to neuronal nAChRs, involving specific residues that render nAChR insensitive to  $\alpha$ -bgt binding, have already been described in vertebrates but also in insects<sup>28,29</sup>. These results suggest the existence of different types of nAChRs and indicate that the resistance-associated point mutations observed in AcerKis and KdrKis strains differentially affect the cholinergic system involving nAChRs.

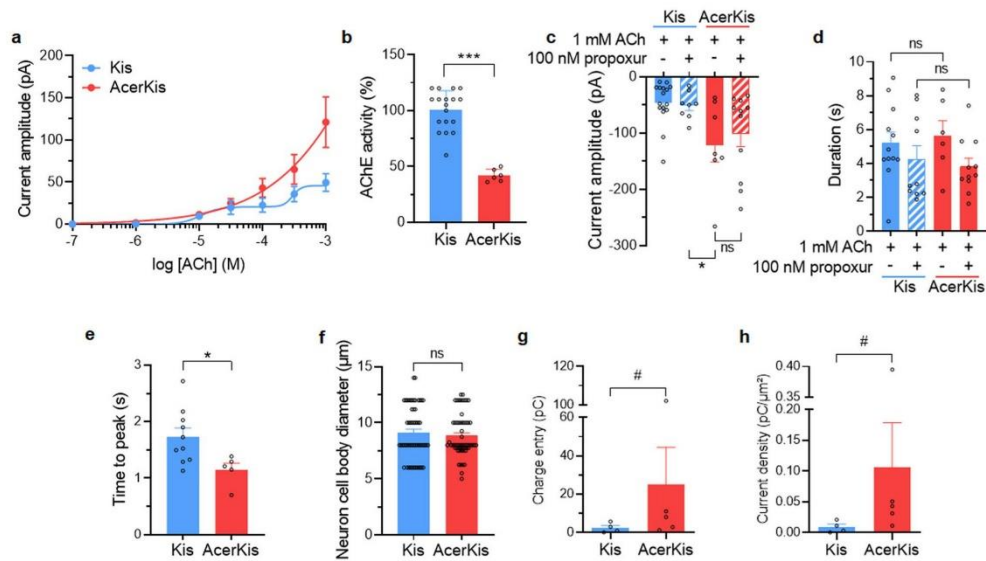


**Fig. 1** Acetylcholine induces transient inward currents in isolated neurons from *Anopheles gambiae*, Kis, AcerKis and KdrKis strains. **a** Photograph of the lateral view of a female *Anopheles gambiae*. **b** Light micrograph of the whole cell patch-clamp technique adapted on the isolated adult mosquito neuron cell body. **c** The chemical structure of the natural neurotransmitter acetylcholine. **d** Typical examples of steady-state recordings of acetylcholine (ACh)-induced inward currents obtained in whole-cell voltage-clamp mode at a steady-state holding potential of  $-50$  mV. Pulse of ACh (1 mM, 3 s in duration) was applied onto the isolated neuron cell body from three *Anopheles gambiae* strains, Kis, KdrKis and AcerKis, as indicated below each current trace. **e** Histogram summarizing the ACh-induced current amplitudes recorded at a holding potential of  $-50$  mV in three strains of *Anopheles gambiae* isolated neurons indicated above each bar. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 7-16$ ); Statistical test used was Student unpaired  $t$ -test,  $**p < 0.01$ ; ns, non-significant. **f-h** Comparative histograms illustrating the effect of the nicotinic receptor antagonist  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -bgt; 100 nM) on the ACh-induced inward current amplitudes, recorded at a holding potential of  $-50$  mV in isolated neurons from mosquito strains Kis (**f**), KdrKis (**g**) and AcerKis (**h**). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4-6$ ); Statistical test used was Student unpaired  $t$ -test,  $**p < 0.01$ ;  $*p < 0.05$ ; ns, non-significant. Scale bar 1 cm (**a**) and 10  $\mu$ m (**b**). The number of experiments ( $n$ ) are biologically independent samples. The image presented in **a** is in the public domain and thus free of any copyright restrictions (CDC/James Gathany, 2014).

**Increased density of nAChRs in neurons isolated from AcerKis strain.** To further study the origin of the high current amplitude observed in neurons isolated from AcerKis strains, the mean values of the peak inward current amplitude were plotted against the logarithm of the non-cumulative concentration of ACh. Pulse applications of ACh (3 s in duration), performed at concentrations ranging from 100 nM to 1 mM, induced a biphasic

dose-response curve in Kis neurons (Fig. 2a;  $n = 5-15$ ). The data were best-fitted through the mean data points according to the Eq. (2). An apparent maximum was obtained between 30  $\mu$ M and 100  $\mu$ M of ACh, but it was only a plateau between the two parts of the curve. For higher concentrations than 100  $\mu$ M, ACh-induced current further increased before reaching maximum amplitude at approximately 1 mM. For comparison, the effect of ACh plotted

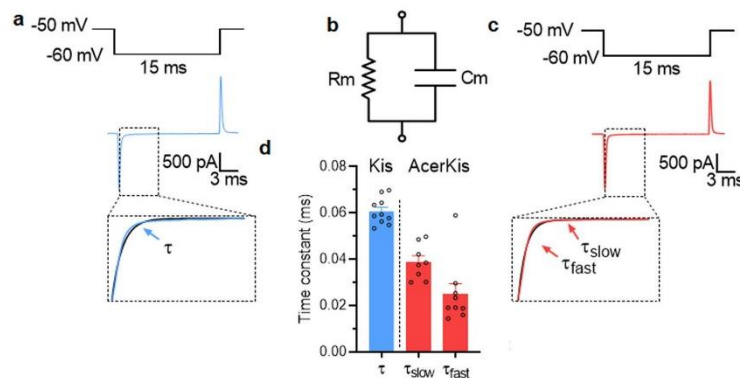




**Fig. 2** Acetylcholine induces higher current amplitude in neurons isolated from *Anopheles gambiae* strain AcerKis. **a** Superimposed semilogarithmic dose-response curves for the ACh-induced currents recorded at a holding potential of  $-50$  mV in isolated neurons from mosquito strains Kis ( $n = 5-15$ ) and AcerKis ( $n = 3-14$ ), as indicated in the graph. Data are mean  $\pm$  S.E.M. **b** Comparative histogram illustrating the % acetylcholinesterase (AChE) activity determined spectrophotometrically in neurons isolated from *Anopheles gambiae* Kis ( $n = 18$ ) and AcerKis ( $n = 6$ ) strains. Bars represent mean  $\pm$  S.D.; Statistical test used was Student unpaired *t*-test, \*\*\* $p < 0.001$ . Note the strong reduction in AChE activity measured in AcerKis neurons. **c, d** Histograms summarizing the effects of the carbamate insecticide, propoxur (100  $\mu M$ ), known to inhibit acetylcholinesterase, on both current amplitudes (**c**) and durations (**d**) evoked by ACh (1 mM, 3 s in duration). The current duration was measured at 50% of the amplitude. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 6-16$ ); Statistical test used was Student unpaired *t*-test, \* $p < 0.05$ ; ns, non-significant. **e** The time to peak of the ACh-induced inward current recorded in AcerKis neurons was compared to that of measured in Kis neurons. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 5-10$ ); Statistical test used was Student unpaired *t*-test, \* $p < 0.05$ . **f** Comparison of cell body diameters between neurons isolated from Kis ( $n = 56$ ) and AcerKis ( $n = 57$ ) strains. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. Statistical test used was the Mann-Whitney test, ns, non-significant. **g, h** Comparative histograms illustrating the charge density (**g**), calculated from the integral of the current according to the Eq. (3) and the current density (**h**) measured from the ACh-evoked inward current recorded in Kis and AcerKis neurons. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4-5$ ). Statistical test used was the Mann-Whitney test # $p < 0.02$ . In all cases, the number of experiments (*n*) are biologically independent samples.

as a semi-logarithmic function was best represented by a monophasic curve fitted by the Hill Eq. (1) in AcerKis neurons. Current amplitudes were enhanced from 100  $\mu M$  ACh compared to those recorded in Kis neurons (Fig. 2a;  $n = 3-14$ ). Previous findings have reported that AChE enzymatic activity was reduced in mosquito AcerKis strains<sup>30,31</sup>. Because AChE is one of the most crucial enzymes that hydrolyzes the neurotransmitter ACh, additional experiments were designed to determine if the reduction of AChE enzymatic activity was correlated with the high current amplitude recorded in isolated AcerKis neurons. Using biochemical assay of AChE enzyme activity performed on isolated neurons, the present study shows that AcerKis neurons also displayed a significant reduction in AChE enzymatic activity (from  $100 \pm 17\%$ ,  $n = 18$ , to  $42 \pm 5\%$ ,  $n = 6$ , in Kis and AcerKis neurons, respectively; Fig. 2b). In accordance with a typical reduction of AChE enzymatic activity, both amplitude and duration of the inward current elicited by ACh should increase, as predicted. However, experiments performed with propoxur (100 nM), the anticholinesterasic carbamate insecticide, did not produce any significant effect on both amplitude and duration of the ACh-induced current recorded in Kis neurons compared to AcerKis neurons (Fig. 2c, d). In other words, the lack of effect of propoxur on the current amplitude in Kis neurons is consistent with the fact that the reduction of AChE enzymatic activity, by

itself, was not responsible for the high ACh-induced current amplitudes recorded in AcerKis neurons. From these results, it is tempting to consider an alternative hypothesis that may account for the high current amplitude observed in AcerKis neurons. Modifying the density of nAChRs in AcerKis neurons will undoubtedly change their activity pattern. To investigate this hypothesis, the time to peak of ACh-induced inward current was first measured to see whether it was modified between Kis and AcerKis neurons. The time to peak current was measured as the delay between the onset of the pulse of ACh and the maximal current. This value was significantly faster in AcerKis neurons ( $1.1 \pm 0.1$  s,  $n = 5$ ) when compared to Kis neurons ( $1.7 \pm 0.1$  s,  $n = 10$ ) (Fig. 2e). In addition, ACh-induced charge entry (calculated from the integral of the current according to the Eq. (3)) and current density were also determined in both Kis and AcerKis neurons. For that purpose, the mean values of the surface areas were calculated from the estimated neuron cell body diameters illustrated in Fig. 2f. In this case, the soma of Kis neurons were usually  $9.0 \pm 0.3$   $\mu m$  ( $n = 56$ ) in diameter (mean neuron surface area of  $271.8 \pm 17.7$   $\mu m^2$ ) and  $8.8 \pm 0.2$   $\mu m$  ( $n = 57$ ) in diameter (mean neuron surface area of  $258.3 \pm 15$   $\mu m^2$ ) for AcerKis neurons. This analysis showed a clear increase in ACh-induced charge entry in AcerKis neurons ( $25.1 \pm 19.3$  pC;  $n = 5$ ) compared to Kis neurons ( $2.5 \pm 1.2$  pC;  $n = 4$ ) (Fig. 2g). A similar



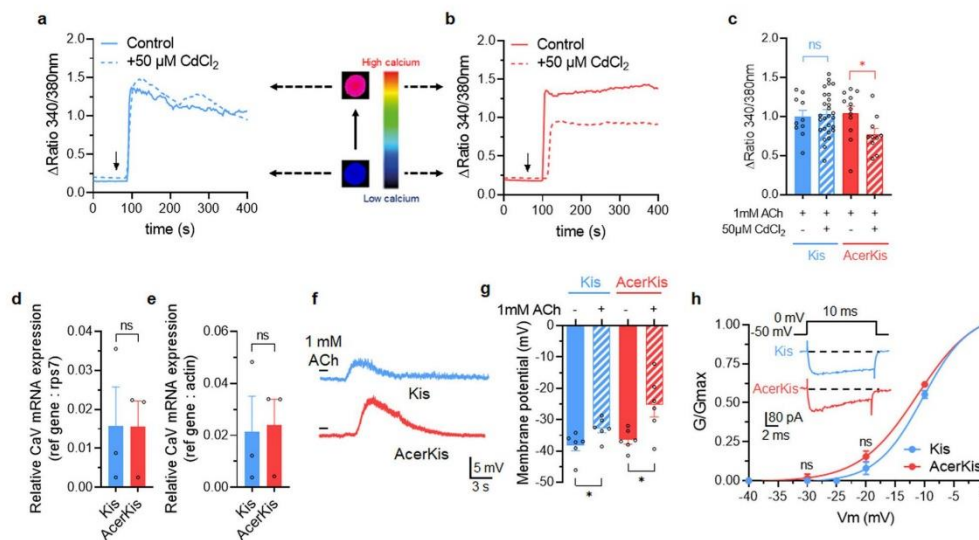
**Fig. 3** Total membrane capacitance measurement in isolated neurons from Kis and AcerKis *Anopheles gambiae* strains. **a–c** Typical examples of the capacitive current transients were recorded under voltage-clamp condition at a holding potential of  $-50$  mV following a hyperpolarized voltage pulse according to the protocols indicated above each trace in Kis (**a**) and AcerKis (**c**) neurons. **(b)** represents the reduced equivalent circuit of the neuron cell body plasma membrane obtained by combining a fixed capacitance ( $C_m$ ) in parallel with ion-specific pathway ( $R_m$ ). The decay phase of the transient was well-fitted with a single exponential in Kis neurons whereas two exponential functions were used to fit the decay phase of the transient in AcerKis neurons giving fast and slow time constants (see text for details). **d** The corresponding comparative histogram illustrates the mean values of the time constants calculated for Kis and AcerKis neurons. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 9$ – $10$ ). The number of experiments ( $n$ ) are biologically independent samples.

increase in ACh current density was also observed in AcerKis neurons ( $0.10 \pm 0.07$  pC/ $\mu\text{m}^2$ ;  $n = 5$ ) when compared to Kis neurons ( $0.01 \pm 0.005$  pC/ $\mu\text{m}^2$ ;  $n = 4$ ) (Fig. 2h). In addition, it has been proposed that the protein content of plasma membrane can influence membrane capacitance ( $C_m$ ) by affecting the dielectric properties of the membrane. Therefore, the whole-cell patch-clamp technique in voltage-clamp mode was applied to monitor changes in  $C_m$ . In this case, a simplified circuit can be used (Fig. 3b) assuming that the neuronal membrane is isopotential, and that no voltage-dependent conductances are active. This model circuit predicts that the current transient, following a hyperpolarized voltage pulse, will have an exponential time course (Fig. 3a, c). Kis and AcerKis neurons were clamped at  $-50$  mV, pulses of  $-10$  mV (15 ms in duration) were applied, and average capacitive transients were obtained from Kis and AcerKis neurons (Fig. 3a, c). The decay phase of the transient was well-fitted with a single exponential ( $0.062 \pm 0.002$  = rms, correlation coefficient  $r^2 = 0.970$ ;  $n = 10$ , Fig. 3a, d), indicating that the simplified  $C_m/R_m$  circuit (i.e., single compartment model, Fig. 3b) provided an adequate description of Kis neurons. Interestingly, the decay phase of the transient in AcerKis neurons was best described by the sum of two exponentials giving the corresponding slow ( $\tau_s$ ) and fast ( $\tau_f$ ) time constants ( $\tau_s = 0.040 \pm 0.002$  ms,  $\tau_f = 0.020 \pm 0.001$  ms, respectively,  $r^2 = 0.970$ ,  $n = 9$ ; Fig. 3c, d). These results obtained for Kis and AcerKis neurons suggest that variation in nAChRs density could affect  $C_m$  in AcerKis neurons. All together, these data indicate that the relationship found between, faster time to peak, increased charge entry and ACh current density, irrespective of the average soma diameter (Fig. 2f) and changes in  $C_m$ , may be explained by higher density of functional nAChRs expressed in AcerKis neurons. This contributes notably to increase the flow of ions through nAChRs, which thereby produce larger ACh-induced current amplitude in AcerKis than in Kis neurons.

#### Functional expression of different types of nAChRs in neurons isolated from AcerKis strains. It is known that both extracellular and intracellular calcium modulate the agonist-induced currents

of native insect neuronal nAChRs<sup>28,32–34</sup>. Because  $\alpha$ -bgt tested did not appear to discriminate between different types of nAChRs expressed in AcerKis neurons (see Fig. 1h), we found an alternative way of separating nAChRs by studying the putative influence of extracellular calcium on ACh-evoked response in Kis and AcerKis neurons. Using calcium imaging, comparative experiments were performed in isolated Fura-2 loaded Kis and AcerKis neurons. As shown in Fig. 4a, b, ACh (1 mM) produced an elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , followed by a sustained elevated level in both Kis and AcerKis neurons. We next examined the source of the intracellular calcium rise observed in both neurons. When the experiments were performed in the presence of  $\text{CdCl}_2$  (50  $\mu\text{M}$ ), a voltage-gated calcium channel blocker, the ACh-induced elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was significantly reduced (by 26%) in AcerKis neurons whereas  $\text{CdCl}_2$  had no effect on the intracellular calcium rise in Kis neurons (Fig. 4c). These results suggest that the elevation in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in AcerKis neurons results, in part, from extracellular calcium through plasma membrane calcium channels. By contrast, voltage-gated calcium channels seemed not to be involved in Kis neurons. One possible explanation of this contrasting result may be the difference of the expression level of voltage-gated calcium channels between Kis and AcerKis neurons. Using transcriptional analysis by RT-qPCR carried out on both mosquito strains, we demonstrated that no differences were found in the  $\alpha 1$ -subunit of voltage-gated calcium channel mRNA levels between Kis and AcerKis neurons (Fig. 4d, e). Consequently, these results raise the question whether the voltage-gated calcium channels can differently be activated by ACh in both Kis and AcerKis neurons. To address this, we performed current-clamp experiments to compare the ACh-induced membrane depolarization in Kis and AcerKis neurons. The membrane depolarization response following pulse application of ACh (1 mM, 3 s in duration) was significantly greater in AcerKis than in Kis neurons (Fig. 4f, g,  $n = 6$ ). To further demonstrate that ACh-mediated response was sufficient to depolarize AcerKis neurons to voltage-gated calcium channel threshold, we next focused on the study of activation properties of voltage-gated calcium current. The solutions used to record whole-cell calcium currents were designed to eliminate interferences from outward potassium

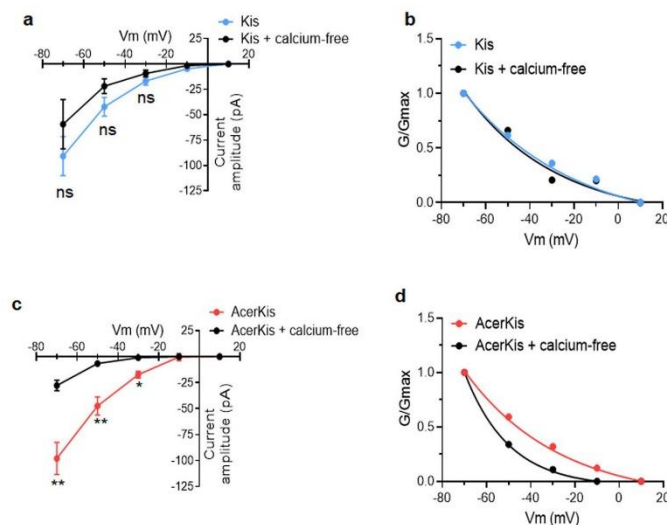




**Fig. 4** Acetylcholine activates voltage-dependent calcium channels in AcerKis neurons. **a–c** Bath application of acetylcholine (ACh, 1 mM) increased intracellular free calcium concentration in Fura-2-loaded Kis (**a**) and AcerKis (**b**) neurons. Pretreatment with the voltage-gated calcium channel blocker CdCl<sub>2</sub> (50 μM) significantly reduced ACh-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise in AcerKis neurons (**b, c**) but did not produce any effect on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> elevation in Kis neurons (**a, c**). *Inset* shows images of Fura-2 fluorescence of a single neuron cell body isolated from Kis and AcerKis strains after application of 1 mM ACh. Bars represent mean ± S.E.M. ( $n = 10–27$  for Kis neurons and  $n = 10–12$  for AcerKis neurons). The statistical test used was Student unpaired *t*-test, \* $p < 0.05$ ; ns, non-significant. **d, e** Comparative histograms illustrating the relative voltage-gated calcium channel mRNA expression in Kis and AcerKis strains. Note that there is no significant difference in the relative mRNA expression of calcium channels between Kis and AcerKis strains. Bars represent mean ± S.E.M. ( $n = 4$ ). The statistical analysis was made by using Analysis of Variance (one-way ANOVA), ns, non-significant. **f** Effects of ACh on Kis and AcerKis neuronal nAChRs studied under current-clamp condition. Pulse application of ACh (1 mM, 3 s in duration) produced a membrane depolarization in AcerKis neurons greater than in Kis neurons. **g** Histogram illustrating the effects of the ACh-induced membrane depolarization in Kis and AcerKis neurons. Bars represent mean ± S.E.M. ( $n = 6$ ). The statistical test used was Student unpaired *t*-test, \* $p < 0.05$ . **h** Characterization of the voltage-gated calcium current studied under voltage-clamp condition according to the protocol indicated above each current trace. *Inset* represents typical examples of the voltage-dependent inward calcium current recorded in Kis and AcerKis neurons. Currents are capacity- and leak-corrected. Voltage dependence of the normalized conductance of the inward calcium current, in Kis ( $n = 3–5$ ) and AcerKis ( $n = 3–7$ ) neurons, calculated according to Eq. 6. Bars represent mean ± S.E.M. The statistical test used was Student unpaired *t*-test, ns, non-significant. In all cases, the number of experiments ( $n$ ) are biologically independent samples.

and inward sodium currents (see methods). The electrophysiological protocol used to record inward calcium currents was based on previous findings indicating the existence of High Voltage-Activated (HVA) calcium channels (CaV1) in *Anopheles gambiae* neurons<sup>27</sup>. As shown in Fig. 4h (*inset*), inward calcium currents in both Kis and AcerKis neurons were elicited by a voltage step from  $-50$  mV to  $0$  mV (10 ms in duration). The total inward current activated at these potentials did not inactivate completely within the duration of the test pulse. The mean amplitudes of the calcium currents were  $-85.90 \pm 16.83$  pA and  $-86.14 \pm 10.28$  pA in Kis and AcerKis neurons, respectively ( $n = 10$ ). It should be noted that bath application of  $50 \mu\text{M CdCl}_2$  completely blocked the inward calcium current in both neurons. The voltage range for activation of the inward calcium current can be assayed from the amplitude of the peak currents after pulses of various amplitudes (from  $-40$  mV to  $0$  mV, in 10 mV increments, holding potential of  $-50$  mV). Figure 4h illustrated normalized plots of the conductances as a function of the voltage activation. To compare more quantitatively the voltage dependency of the two conductances, the voltage relationships were fitted by a Boltzmann Eq. (7). As shown in Fig. 4h, there was no difference in the voltage dependence of calcium conductances between Kis and AcerKis neurons ( $n = 3–7$ ). Both inward calcium currents were activated in a positive potential range around

$-25$  mV. By comparing the results from Kis neurons (Fig. 4f, g), the ACh-induced depolarization recorded in AcerKis neurons is strong enough to reach the voltage-gated calcium channel activation threshold and to generate calcium influx. This confirms the effect of CdCl<sub>2</sub> on the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise that is only observed in AcerKis and not in Kis neurons (Fig. 4a, b). It also demonstrates a clear difference in the pattern of the nAChRs density in AcerKis neurons, when compared to Kis neurons. They can elevate intracellular calcium levels indirectly because of their ability to further depolarize the neuronal cell body membrane, which thereby activate cell body voltage-gated calcium channels previously described<sup>35–37</sup>. It is also known from the genome sequence that *Anopheles gambiae* can express multiple classes of nAChRs<sup>38–40</sup>. Some of them are capable of elevating [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> directly because of their permeability to calcium. Because CdCl<sub>2</sub> failed to completely block the intracellular calcium rise observed in Kis and AcerKis neurons (Fig. 4a, b), experiments were performed in an EGTA-buffered calcium free superfusing solution (Supplementary Fig. 1). Using calcium imaging, pulse application of ACh (1 mM, 3 s in duration) was ineffective in producing any [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise in both Kis and AcerKis neurons (Supplementary Fig. 1a, e). Interestingly, the whole-cell patch clamp studies indicated that the concentration-dependent increase of ACh-induced inward current amplitudes were not affected in Kis



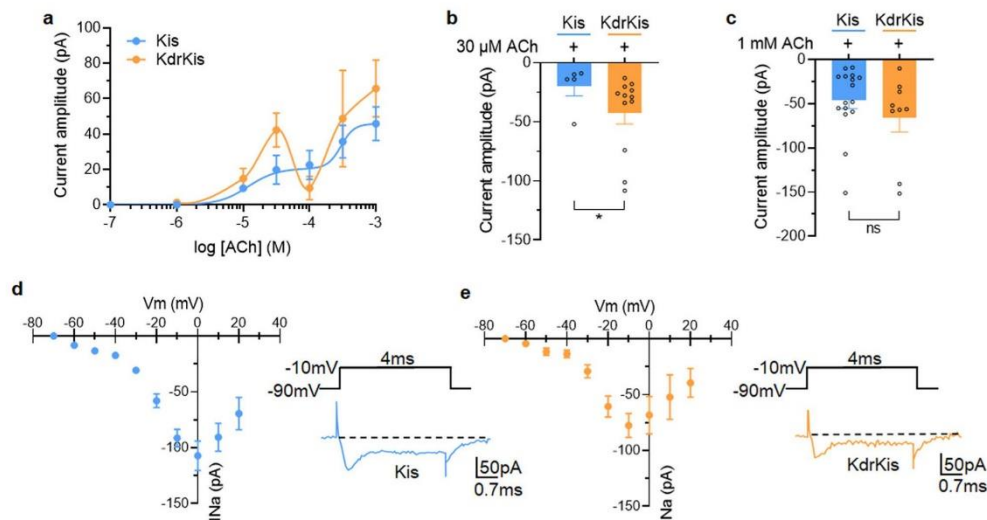
**Fig. 5** Pretreatment with EGTA-buffered calcium-free solution reduces the ACh-induced current amplitude in AcerKis neurons but has no effect in Kis neurons. **a, c** The ACh-evoked inward current currents (pulse application of 1 mM ACh, 3 s in duration) were recorded for holding potentials ranging from  $-70$  to  $+10$  mV with 10 mV steps every 2 min in control and in the presence of EGTA-buffered calcium-free solution in Kis neurons (**a**) and in AcerKis neurons (**c**). The mean values of the peak current amplitude recorded in Kis neurons ( $n = 6-9$ ) and in AcerKis neurons ( $n = 3-9$ ) were plotted as a function of the holding potential. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. The statistical test used was Student unpaired t-test,  $**p < 0.01$ ;  $*p < 0.05$ ; ns, non-significant. The number of experiments ( $n$ ) are biologically independent samples. It should be noted that the ACh-induced current amplitude recorded in AcerKis neurons is significantly reduced in the presence of EGTA-buffered calcium-free solution. **b, d** Normalized chord conductances of ACh-induced current ( $G/G_{max}$ ) are plotted versus membrane potential in control and in the presence of EGTA-buffered calcium-free solution in Kis (**b**) and AcerKis (**d**) neurons. Changes in the current amplitude and the associated reduction in the maximal calculated conductance indicate that nAChRs activated by ACh (1 mM) are at least permeable to calcium in AcerKis neurons.

neurons pretreated with calcium free extracellular solution (Supplementary Fig. 1b-d). By contrast, ACh-evoked inward current amplitude was significantly reduced in AcerKis neurons but only for concentrations above  $100 \mu\text{M}$  (Supplementary Fig. 1f-h). These results suggest that nAChRs expressed in Kis neurons should not be permeable to calcium ions. On the contrary, the ACh-induced current amplitude reduced by removal of calcium ions from the extracellular solution indicates that the inward current in AcerKis neurons is carried at least in part by calcium. This last effect only observed for higher concentration than  $100 \mu\text{M}$ , supports the idea that distinct types of nAChRs are present on the AcerKis neurons, which thereby can also be distinguished on the basis of their differential sensitivity to ACh. Finally, evaluation of nAChRs calcium permeability in AcerKis neurons compared to Kis neurons was further studied. ACh-induced currents (pulse application of 1 mM ACh, 3 s in duration) were recorded for steady-state holding potentials ranging from  $-70$  to  $+10$  mV (in 10-mV increments) in the control condition and after pretreatment with the calcium-free extracellular solution (Fig. 5a, c,  $n = 3-9$ ). It should be noted that using this protocol, voltage-gated calcium channels are inactivated. In both cases, ACh failed to evoke detectable current for potentials above 0 mV, indicating a strong rectification of the nAChRs. The calcium-free solution induced no significant reduction of neither the ACh-evoked current amplitude nor the chord conductance well described by a monoexponential fit, through nAChRs in Kis neurons (Fig. 5a, b). When AcerKis neurons were pretreated with calcium-free extracellular solution, the amplitude of the ACh-induced current was very weak and significantly reduced

compared to control condition (Fig. 5c). Changes in the current amplitude and the associated reduction in the maximal calculated conductance (Fig. 5d), confirm that nAChRs, activated in the concentration of ACh ranging from  $100 \mu\text{M}$  to 1 mM (Supplementary Fig. 1f, h), are at least permeable to calcium in contrast to other nAChRs activated for the lower concentration range (Supplementary Fig. 1f, g). Regarding the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise recorded in Kis neurons, many other direct and/or indirect mechanisms can rapidly increase intracellular calcium levels. This will need further investigations, which are not the topic of the present study.

**Acetylcholine has different effects on nAChRs in neurons isolated from *Anopheles gambiae* KdrKis strains.** Evaluation and comparison study of ACh were performed on KdrKis neurons isolated from the *Anopheles gambiae* strain, KdrKis (*kdr*, L1014F). Using whole-cell patch clamp technique, we showed that pulse application of ACh induced multiphasic inward current amplitude depending on the concentrations tested (Fig. 6a). The mean values of the ACh-induced current amplitudes, plotted against the logarithm of the non-cumulative concentrations of ACh, revealed an unexpected first component recognized as a « bell-shaped » between  $1 \mu\text{M}$  and  $100 \mu\text{M}$ , with a higher maximum amplitude reached at  $30 \mu\text{M}$ , when compared to Kis neurons ( $-42.3 \pm 9.5$  pA, ( $n = 12$ ) and  $-19.8 \pm 8.1$  pA, ( $n = 5$ ) in KdrKis and Kis neurons, respectively; Fig. 6a, b). For higher concentrations than  $100 \mu\text{M}$ , inward current amplitude further increased before reaching similar maximum amplitudes obtained at 1 mM, as compared with Kis neurons (Fig. 6a, c).

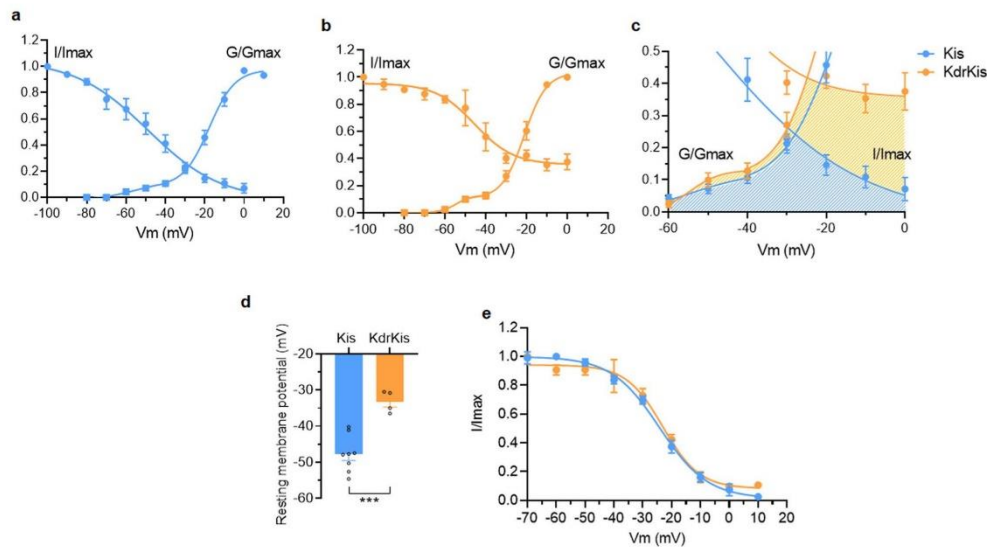




**Fig. 6** Acetylcholine has different effects on nAChRs in neurons isolated from *Anopheles gambiae* KdrKis strains. **a** Superimposed semilogarithmic dose-response curves for the ACh-induced currents recorded at a holding potential of  $-50$  mV in isolated neurons from mosquito strains Kis and KdrKis, as indicated on the graph. Note that for concentration lower than  $100$   $\mu$ M (i.e.,  $30$   $\mu$ M), ACh produced higher current amplitude than in Kis neurons. Data are mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ – $16$ ). **b, c** Comparative histogram showing the effects of pulse application of ACh (3 s in duration) tested at  $30$   $\mu$ M (**b**,  $n = 5$  and  $n = 12$ , for Kis and KdrKis, respectively) and  $1$  mM (**c**,  $n = 16$  and  $n = 9$  for Kis and KdrKis, respectively). Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. Statistical test used was the Mann-Whitney test,  $*p < 0.05$ ; ns, non-significant. **d, e** Voltage dependence of the inward sodium current recorded in Kis and KdrKis neurons. Current-voltage relationship constructed from values of maximum current amplitude plotted as a function of test potentials (holding potential  $-90$  mV) in Kis (**d**,  $n = 6$ – $7$ ) and KdrKis (**e**,  $n = 4$ – $7$ ). Insets represent typical examples of inward sodium currents elicited with a 4 ms depolarizing pulse to  $-10$  mV applied from a holding potential of  $-90$  mV. Currents are capacity- and leak-corrected. Note that in both Kis and KdrKis neurons, the inward sodium current present an incomplete inactivation during the maintained depolarization. However, the current amplitude is smaller in KdrKis neurons compared to that of Kis neurons. Data are mean  $\pm$  S.E.M. In all cases, the number of experiments ( $n$ ) are biologically independent samples.

To gain further insight into why L1014F mutation increases ACh-evoked current amplitude at relatively low concentration (i.e.,  $30$   $\mu$ M) in KdrKis neurons, we first investigated under voltage-clamp condition the biophysical properties of the voltage-gated sodium current in both Kis and KdrKis neurons in the presence of potassium and calcium channel blockers (see methods). Figure 6d, e (insets) shows typical examples of inward sodium currents elicited by a voltage step from  $-90$  to  $+10$  mV (4 ms in duration) in Kis and KdrKis neurons. It should be noted that the inward sodium current did not inactivate completely within the duration of the test pulses. As previously shown in Kis neurons, the sodium current was completely blocked by TTX<sup>27</sup>. For comparison, Fig. 6d, e illustrates the averaged current-voltage ( $I/V$ ) relationship for the peak current in Kis and KdrKis neurons. In both cases, the inward sodium current began to appear at a membrane potential above  $-60$  mV, rising steeply and peaking at  $0$  mV and  $-10$  mV, in Kis and KdrKis neurons, respectively. In KdrKis neurons, however, the maximum peak current amplitude was smaller ( $-77.5 \pm 10.7$  pA at  $-10$  mV, ( $n = 4$ – $7$ ) than that of recorded in Kis neurons ( $-107.1 \pm 13.2$  pA at  $0$  mV in Kis neurons,  $n = 6$ – $7$ ). The inward sodium current then decreased to an extrapolated potential around  $+65$  mV, a value close to the calculated Nernstian equilibrium potential for sodium ions in our experimental conditions ( $+73.6$  mV). We next focused on the study of activation and inactivation properties of the inward sodium current in Kis and KdrKis neurons (Fig. 7a, b). The voltage range for activation of the inward sodium currents can be assayed from peak current amplitudes after pulses of

various amplitudes ( $-80$  to  $+10$  mV, in  $10$ -mV increments), from a holding potential of  $-90$  mV. Conductance values were calculated by dividing the peak current amplitude by the driving force at each potential and normalizing to the maximum conductance according to the Eq. (6). As illustrated (Fig. 7a, b), the voltage curves of the conductance revealing a biphasic aspect were best fitted according to a double Boltzmann Eq. (8). The corresponding activation parameters were measured for Kis and KdrKis neurons and summarized in the Supplementary Table 1. To measure the voltage-dependence of the inward sodium current steady-state inactivation, a two-pulse voltage-clamp protocol was used. Inactivation properties were studied by applying a conditioning pulse between  $-110$  and  $+20$  mV ( $10$ -mV increments) that was long enough (500-ms) to allow the inactivation process to reach its steady-state level. Thereafter, the membrane potential was stepped back to the holding potential ( $-90$  mV) for 1 ms to ensure that the activation variable remained constant, and a 15 ms test pulse was applied to  $-10$  mV. The inactivation curves were obtained by plotting the amplitude of the peak sodium currents against the conditioning potential (Fig. 7a, b). The smooth line corresponds to the best fit through the mean data points using a single Boltzmann distribution (see Eq. 9). The values of the voltage-dependence of steady-state inactivation parameters were given in Supplementary Table 1 for Kis and KdrKis neurons. The amplitude of the peak inward sodium current decreased as the depolarizing conditioning pulse was made more positive, indicating that fewer channels were available for activation at positive potentials (Fig. 7a, b). Although the



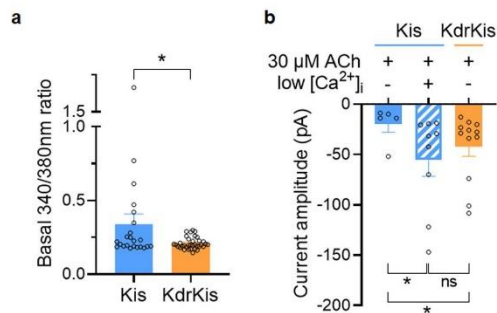
**Fig. 7 Biophysical properties of the voltage-gated sodium currents in neurons isolated from Kis and KdrKis strains influence membrane potential and voltage-gated calcium channel availability.** **a**, **b** Voltage-dependence of steady-state inactivation and conductance parameters of the voltage-gated inward sodium current in Kis (**a**,  $n = 7-8$ ) and KdrKis (**b**,  $n = 4-6$ ) neurons. Data points are mean values  $\pm$  S.E.M. Smooth curves were fitted through the data points using Boltzmann distributions (see Eqs. 8 and 9 for normalized conductance and inactivation, respectively). **c** Enlarged colored areas indicate overlap between activation and inactivation curves for Kis (blue) and KdrKis (orange) neurons, which is expected to result in a window current; this window current being largest for KdrKis voltage-gated sodium channels. **d** Comparative histogram illustrating the values of the resting membrane potential recorded under current-clamp condition in Kis and KdrKis neurons. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 8$  and  $n = 4$  for Kis and KdrKis neurons, respectively). The statistical test used was Student unpaired *t*-test, \*\* $p < 0.01$ . **e** Voltage-dependent steady-state inactivation of the voltage-gated calcium current studied with the two-pulse voltage-clamp protocol (see text for details) in Kis ( $n = 7$ ) and KdrKis ( $n = 4$ ) neurons. Smooth curves of inactivation were fitted through data points using Boltzmann distribution (Eq. 9). Data are mean  $\pm$  S.E.M. In all cases, the number of experiments ( $n$ ) are biologically independent samples.

voltage dependence of inactivation was not different between Kis and KdrKis sodium channels (Supplementary Table 1), the inactivation was incomplete in KdrKis neurons (Fig. 7b) when compared to Kis neurons (Fig. 7a). The steady-state inactivation and conductance voltage (activation) curves for Kis sodium currents intersected near  $-30$  mV, while those for KdrKis intersected around  $-25$  mV (Fig. 7c). The resulting increase in overlap of activation and inactivation of KdrKis sodium channels predicts a larger steady-state window current, which is expected to generate a «steady» influx of sodium into the neurons and a resulting tonic depolarization of KdrKis neurons (Fig. 7c). Therefore, current-clamp experiments were performed to measure the resting membrane potential in Kis and KdrKis neurons. As presented in Fig. 7d, we confirmed that the resting membrane potential was significantly lower in KdrKis neurons ( $-33.2 \pm 1.7$  mV,  $n = 4$ ), compared to Kis neurons ( $-47.8 \pm 1.9$  mV,  $n = 8$ ). It is known that the calcium influx is an important determinant of the regulation of nAChR sensitivity to ACh, suggesting that calcium is of special interest because of its implications for nAChR function. We previously indicated that nAChRs expressed in KdrKis differ in their sensitivity to low concentration ACh (i.e.,  $30 \mu\text{M}$ ) compared to those present in Kis neurons (Fig. 6a). Furthermore, the fast inactivation of voltage-dependent calcium channels is an important, intrinsic regulatory mechanism that helps to control calcium entry into neurons. We then studied the putative consequence of the depolarized membrane potential on the contribution of calcium channel activated in KdrKis neurons. For that purpose, inactivation properties were studied by applying a 200-ms conditioning pulse between  $-70$  and  $+10$  mV (in

$10$ -mV increments). Thereafter, the membrane potential is stepped back to the holding potential ( $-50$  mV) for 5 ms before a  $10$ -ms test potential to  $0$  mV. The peak current at different holding potentials was normalized to the maximum peak current recorded from the holding potential of  $-70$  mV. As shown in Fig. 7e, the amplitude of the peak calcium current decreased as the depolarizing conditioning pulse was made more positive in both Kis and KdrKis neurons. It is interesting to note that in KdrKis neurons, at resting membrane potential ( $-33.2 \pm 1.7$  mV), only 80% of calcium channels were in an activable state, compared to Kis neurons (100% at  $-47.8 \pm 1.9$  mV, Fig. 7d, e). In parallel and based on these results, using calcium imaging, we compared the steady-state resting intracellular calcium level in Fura-2 loaded Kis and KdrKis neurons (Fig. 8a). Interestingly, a significant decrease was observed in resting calcium level in KdrKis neurons compared to Kis neurons. Taken together, these results prompt us to examine whether the effect of reduced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  could also modify the nAChR sensitivity to  $30 \mu\text{M}$  ACh in Kis neurons, compared to KdrKis neurons. When relatively low calcium concentration (i.e.,  $0.01 \mu\text{M}$  rather than  $0.1 \mu\text{M}$ , see methods) was introduced into the Kis neuron through the patch pipette, the ACh-induced current had a very similar amplitude compared to that of in KdrKis neurons (Fig. 8b). These results indicate that low  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was responsible for the increase in ACh-induced current amplitude, observed at relatively low concentration of ACh, in KdrKis neurons (Figs. 6a and 8b).

**The effectiveness of the neonicotinoid insecticide, clothianidin differs with changes in neuronal nAChR properties following**





**Fig. 8 Lowering intracellular calcium concentration in Kis neuron cell body mimicks the ACh-induced current amplitude recorded in KdrKis neurons.** **a** Comparative histogram illustrating the steady-state resting intracellular calcium level (expressed as ratio 340/380 nm) measured in Fura-2-loaded Kis ( $n = 11$ ) and KdrKis ( $n = 36$ ) neuron cell bodies. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. Statistical test used was the Mann-Whitney test,  $*p < 0.05$ . **b** Comparative histogram illustrating the effect of the internal pipette solution containing low intracellular calcium concentration (0.01  $\mu$ M) on the ACh-induced current ( $n = 9$ ) amplitude in Kis neurons ( $n = 5$ ) compared to KdrKis ( $n = 9$ ) and Kis neurons in control conditions. Note that lowering intracellular calcium concentration increases the ACh-induced current amplitude in Kis neurons, an amplitude, which is very close to that of recorded in KdrKis neurons in control. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. Statistical test used was the Mann-Whitney test,  $*p < 0.05$ , ns, non-significant. In all cases, the number of experiments ( $n$ ) are biologically independent samples.

**the mutations G119S in AcerKis strain and L1014F in KdrKis strain.** Changes in the neuronal physiological properties including nAChR functions observed in AcerKis and KdrKis neurons compared to Kis neurons are given in the radar graph illustrated in Fig. 9a, b. Briefly, 4 specific parameters were clearly differentially affected in Kis, AcerKis and KdrKis neurons. We then studied in both in vitro and in vivo if these physiological modifications can be associated with an alteration in insecticide effectiveness. Comparative experiments were performed with the neonicotinoid insecticide, clothianidin, a new class of chemistry for public health, known to act as an agonist on insect nAChRs<sup>41–44</sup>. Using calcium imaging, clothianidin (0.1 nM, Fig. 9c) was tested in Fura-2 loaded neurons isolated from Kis, AcerKis and KdrKis strains (Fig. 9d, e). Clothianidin induced a significant intracellular calcium rise in AcerKis neurons in contrast to the lack of effect of the insecticide on  $[Ca^{2+}]_i$  in KdrKis neurons compared to Kis neurons.

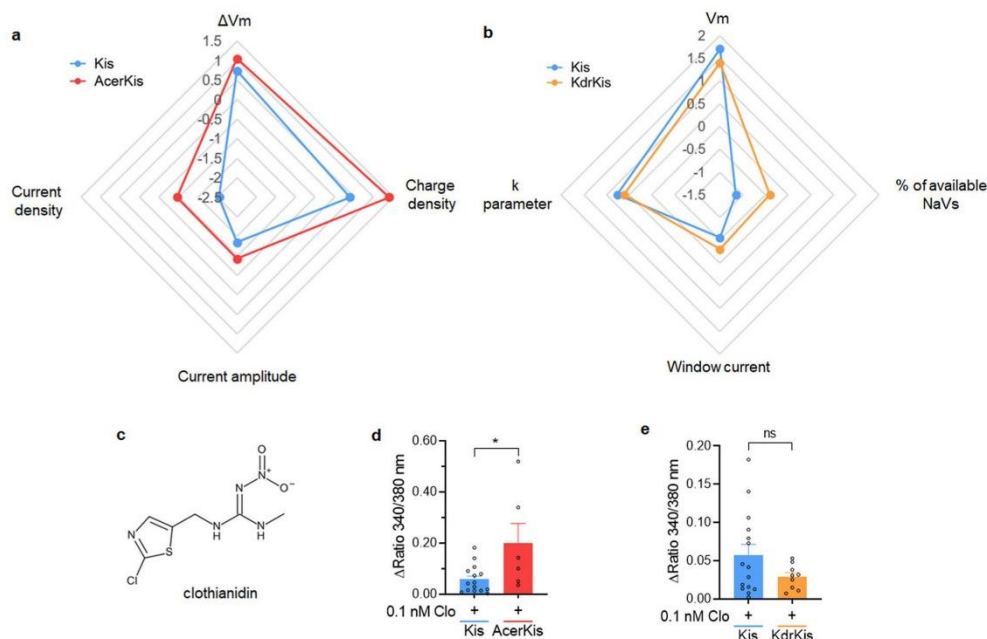
To verify that compensation mechanisms also influence insecticide efficacy in vivo, clothianidin was tested on Kis, AcerKis and KdrKis larvae. In each strain, between 2400 to 3200 larvae of the late-third to early-fourth instar (700 subject larvae and 100 control larvae in one test) were tested for their susceptibility to clothianidin after 24 and 48 h exposure. The calculated averaged lethal concentrations  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  are summarized in Table 1 with their 95% confidence interval (CI). After 24 h exposure to clothianidin,  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  were similar among the three strains as they ranged from 0.018 to 0.032 mg/L, and from 0.042 to 0.081 mg/L, respectively. After 48 h exposure to clothianidin,  $LC_{50}$  and  $LC_{95}$  were shifted towards lower doses as they ranged from 0.012 to 0.029 mg/L, and from 0.024 to 0.059 mg/L, respectively. This global range shift was assimilated to a longer exposition to insecticide. Interestingly, with a 48 h contact time,  $LC_{50}$  was lower for AcerKis strain and higher for KdrKis

strain when compared with Kis strain. These results demonstrate that clothianidin has a better efficacy on AcerKis larvae, and a lower efficacy on KdrKis larvae when compared with the reference Kis strain. They are in line with our in vitro data, therefore confirming that cellular and molecular compensation mechanisms resulting from G119S and L1014F mutations modulate the response to insecticides targeting nAChRs efficacy in vivo.

## Discussion

Our results show that compensatory mechanisms with no previous known functions, play a key role in conferring changes in insecticide efficacy in two strains of resistant *Anopheles gambiae* AcerKis and KdrKis through an alteration of the cholinergic system involving nAChRs.

These compensatory mechanisms appear to be the consequences of the point mutation in the voltage-gated sodium channels<sup>5,9,24</sup> and AChE1 genes<sup>25,26,45</sup> characterized in KdrKis and AcerKis *Anopheles gambiae*, respectively. In the AcerKis strain, previous findings and this study reveal that AChE activity is strongly reduced. It has been demonstrated that the 119 position is close to the catalytic Serine (S200). The G-to-S substitution reduces accessibility to substrate, such as ACh by steric hindrance<sup>30,31,45,46</sup>. In the insect central nervous system (CNS), the evoked release of ACh activates extrasynaptic and/or synaptic homomeric/heteromeric nAChRs<sup>47–49</sup>. ACh action is terminated by AChE. The first effect of the reduced AChE enzymatic activity has been described at synaptic level. Previous findings have reported that any means that increased ACh concentration within the synaptic cleft can induce direct activation of presynaptic mAChRs (M2 mAChR-subtypes) involved in the negative feedback mechanism, decreasing subsequent release of ACh<sup>48</sup>. Beside this effect, the increased concentration of ACh exposure can desensitize/inactivate nAChRs<sup>50,51</sup>, which will alter neuronal function. Although in AcerKis strains, a potential advantage can be gained via the G119S mutation conferring resistance to insecticides, there is an opposing need to conserve normal physiological function. Because a decreased AChE activity may result in an elevation of non-hydrolyzed ACh concentration, we suggest that the increase in nAChRs density observed in AcerKis neurons (Fig. 9a) is a key adaptation to gradually increasing ACh levels to avoid nAChR desensitization in order to guarantee the normal neuronal physiological function. In other words, a higher nAChRs density will lead to less severe receptor desensitization to compensate prolonged high concentration of ACh exposure, which is expected to be observed with the same high level of ACh in Kis neurons. This indicates that for a given concentration of ACh, « proportional » occupancy increases with increased receptors density. This interesting concept has recently been proposed for human 5-HT3A expressed in *Xenopus* oocytes<sup>52</sup>. Another second mechanism can also be proposed to reinforce the role of this compensatory mechanism. The additional nAChR population permeable to calcium activated by relatively high concentration could also promote recovery of desensitization observed in response during sustained ACh application. In this case, the rise in intracellular calcium concentration can regulate desensitization by altering the balance of kinase/phosphatase function with an increase in cellular phosphorylation promoting recovery of desensitization<sup>36,50,53,54</sup>. This will represent an additional major mechanism for the upregulation of nAChR to avoid desensitization resulting from the high level of ACh present in AcerKis. In this case, the compensatory mechanism could help to reduce the otherwise deleterious effects caused by G119S mutation. Because there is no data available yet, understanding these adaptive mechanisms is expected to provide insight on



**Fig. 9 Summary of the physiological parameters changes observed in neurons isolated from AcerKis and KdrKis strains and neonicotinoid insecticide clothianidin effectiveness in increasing neuronal  $[Ca^{2+}]_i$ .** **a, b** Radargraph comparing the changes (logarithmic scale) in the most important physiological parameters observed in Kis, AcerKis (**a**) and KdrKis (**b**) neurons. The effects of clothianidin (**c**) was studied in Fura2-loaded Kis, AcerKis and KdrKis neuron, using calcium imaging. **d, e** Comparative histogram illustrating the effects of clothianidin (0.1 nM) on the  $[Ca^{2+}]_i$  recorded in AcerKis (**d**) and KdrKis (**e**) neurons compared to Kis neurons. Note that the  $[Ca^{2+}]_i$  rise was greater in AcerKis than in KdrKis, indicating the key role of intracellular calcium level in the modulation of the nAChR sensitivity to clothianidin. Bars represent mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 15$ ,  $n = 6$  and  $n = 9$  for Kis, AcerKis and KdrKis neurons, respectively). The statistical test used was Student unpaired  $t$ -test,  $^*p < 0.05$ , ns, non-significant. The number of experiments ( $n$ ) are biologically independent samples.

**Table Larval susceptibility of *Anopheles gambiae* Kis, AcerKis and KdrKis to clothianidin.**

Mosquito strain	$n^a$	Contact time	LC <sub>50</sub> (95% CI)	LC <sub>95</sub> (95% CI)
Kis	4	24 h	0.030 (0.026–0.036)	0.062 (0.05–0.101)
	4	48 h	0.019 (0.015–0.022)	0.039 (0.032–0.057)
AcerKis	4	24 h	0.018 (0.014–0.026)	0.042 (0.031–0.076)
	3	48 h	0.012 (0.010–0.013)	0.024 (0.021–0.034)
KdrKis	4	24 h	0.032 (0.024–0.041)	0.081 (0.059–0.13)
	3	48 h	0.029 (0.025–0.033)	0.059 (0.049–0.078)

<sup>a</sup>One test includes 700 subject larvae and 100 control larvae. The number of experiments ( $n$ ) are biologically independent samples. Lethal concentrations (LC) and confidence intervals (CI) are expressed in mg/L.

protection strategies that may be effective against the actions of increased ACh concentration.

Another well-known resistance mechanism related to the point mutation in the insecticide target site in *Anopheles gambiae* is the pyrethroid-resistance associated L1014F mutation in domain II-S6 of the voltage-gated sodium channel (VGSC)<sup>4,5,55–57</sup>. Although the molecular structure of insect and particularly mosquito VGSCs is now characterized<sup>5,56,58</sup>, comparative electrophysiological studies of wild type and modified channels have only been performed with VGSCs functionally expressed in *Xenopus* oocytes<sup>56,59–62</sup>. In this case, modified VGSCs have been obtained either by introducing into the *para* gene construct the mutation conferring substitutions at the L1014 residue or by

expressing, for instance, a recombinant mosquito *Aedes aegypti*  $\alpha$ -*kdr* mutant, constructed by site-directed mutagenesis<sup>63</sup>. To date there is no data available on the electrophysiological properties of VGSC expressed in neurons isolated from the Kis and KdrKis strains. One of the most interesting feature of the biophysical properties of the sodium current, summarized in Supplementary Table 1, is the expanded range of membrane potentials at which sodium channels will be conducting (i.e., window current). This has never been observed with modified sodium channels (i.e., L1014F) expressed in *Xenopus* oocytes<sup>62</sup>. The resulting large steady-state window current (see Fig. 7c), is expected to depolarize KdrKis neurons. As demonstrated in our study, the physiological impact of this steady-state depolarization is a reduced



availability of voltage-gated calcium channels. Although calcium channels have already been described in insect neurons with distinguished physiological functions in the regulation of neuronal excitability and cellular signaling<sup>35,64</sup>, this is the first characterization of functional voltage-gated calcium channels in mosquito neurons with a potential key role in mediating adaptive response, shown as a result of the *kdr* mutation. The critical role of voltage-gated calcium channels in the ACh release and in the calcium signals that contribute to the rapid ACh release is now well established<sup>65</sup>. From our findings, we can hypothesize that the fraction of available calcium channels, reduced by depolarization at neuronal level (Fig. 7d, e), may decrease the amount of ACh released, *in vivo*, suggesting that relatively low concentrations of ACh will reach nAChRs. This could be compensated by increasing nAChR sensitivity as it is observed in KdrKis neurons since the same low concentration of ACh produces a greater effect than in Kis neurons. Today, the question, which is still open concerns the mechanisms involved to convert low-sensitivity nAChR site into a high-sensitivity nAChR site, allowing nAChRs to exert their optimal action on physiological functions. Previous findings have demonstrated differences in agonist sensitivity of neuronal nAChRs, expressed in various insects<sup>40,66</sup>, which depend on intracellular and/or extracellular calcium<sup>28,32,67</sup>. Our results support the hypothesis that intracellular calcium influences the sensitivity of the nAChRs to ACh in KdrKis neurons (Fig. 8). The ability of ACh to produce stronger effect on nAChR in KdrKis neurons seems to be correlated with the lower steady-state resting calcium level compared to Kis neurons. This is confirmed by using the strategy of lowering intracellular calcium concentration, which increases the ACh-induced current amplitude in Kis neurons. Furthermore, the reduced availability of calcium channels, which thereby decreases calcium influx, reinforces our hypothesis that low intracellular calcium concentration can enhance nAChR sensitivity to ACh in KdrKis neurons. Even if the precise intracellular mechanisms involved remains to be elucidated, previous studies have demonstrated the influence of calcium-dependent intracellular signaling pathways mediating phosphorylation/dephosphorylation in the regulation of insect neuronal nAChR sensitivity to cholinergic agonists<sup>67</sup>.

We also report that these unusual specific calcium-sensitive mechanisms illustrating the existence of original compensatory mechanisms to L1014F and G119S mutations in KdrKis and AcerKis neurons, have fundamental consequences on the efficacy of insecticides. As indicated, changes in functional properties of nAChRs together with the influence of intracellular calcium are considered as important clues to understand the opposite effects of the neonicotinoid, clothianidin observed *in vitro* and *in vivo* in AcerKis and Kdrkis strains. The key role of intracellular calcium in mediating modulation of the neonicotinoid efficacy, has previously been reported in other insect neuronal preparations<sup>32,67–69</sup>. The higher density of nAChRs permeable to calcium together with the activation of voltage-gated calcium channels undoubtedly contribute to potentiate the effect of clothianidin in AcerKis neurons. By contrast, the mechanisms involved in the maintenance of low intracellular calcium concentration appear to be responsible for reducing clothianidin efficacy in KdrKis neurons. The interesting aspect of this study is that *in vitro* studies performed in AcerKis and KdrKis neurons correlate well with the clothianidin-induced lethal effects observed *in vivo* on larvae. After 48 h clothianidin exposure, LC<sub>50</sub> is lower for AcerKis strain and higher for KdrKis strain when compared with Kis strain. This strongly suggests that these compensatory mechanisms would also be initiated in the whole insect. Therefore, these data confirm the need for understanding these specific physiological compensatory mechanisms associated with the point mutations to adapt control strategies. This is particularly true for clothianidin, which is now recommended as a vector

control product against *Anopheles* species and used as clothianidin-based formulation<sup>41,42</sup>. In this case, it is interesting to mention that the effectiveness of the formulation containing a mixture of deltamethrin/clothianidin against wild pyrethroid-resistant malaria vectors may be explained by previous studies indicating that deltamethrin, used as synergistic agent, can optimize insecticide efficacy *via* intracellular calcium rise in insect<sup>70</sup>. Because mosquito populations and particularly *Anopheles* species reveal heterogeneous profiles ranging from susceptibility to strong resistance, understanding the compensatory mechanisms related to these point mutations should be taken into account to adapt future strategies<sup>71</sup> and to ensure full vector control, whatever the resistance mechanisms. This knowledge will optimize insecticide-based vector control, essential to prevent clusters of resistant mosquito populations expressing reduced toxicity to a given treatment.

## Methods

**Mosquito strains and rearing.** Three *Anopheles gambiae* female mosquito strains (Kis, AcerKis and KdrKis) were used in this study. The used colony named Kisumu (Kis) was the susceptible resistance-free reference strain. The AcerKis strain is homozygous for the G119S mutation and resistant to both organophosphates and carbamate insecticides<sup>72</sup>. The colony, named KdrKis strain, harbors the L1014F homozygote mutation (*kdr*-west allele) in the gene coding for the voltage-gated sodium channel, which confers resistance to pyrethroids and DDT. The colony was obtained by introgression into the susceptible genetic background of the Kisumu colony the *kdr*-west allele obtained from pyrethroid resistant mosquitoes in Kou Valley, Burkina Faso<sup>73</sup>. Insecticide resistance was confirmed by using insecticide bioassays and genotypic verifications<sup>74</sup>. The colony does not carry any metabolic resistance. Eggs were provided by MIVEGEC laboratory (UMR IRD-CNRS-Montpellier University) from Montpellier, France. Mosquitoes were reared in an 80% humidity and 28 °C temperature environment with a 12 h light/dark photoperiod. After hatching in demineralized water, larvae are fed daily with TetraMin® fish food. Adults are fed daily with a 10% honey solution. Experiments were performed exclusively on emergent mosquitoes from the day.

**Neuron isolation procedure.** Mosquitoes were anesthetized at 4 °C and disposed under binocular microscope. Antennae, maxillary palps, labium and antennal pedicels were removed carefully. Heads were excised and placed in mosquito saline containing 130 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 50 mM sucrose, 5% fetal bovine serum, 50 µg/mL streptomycin, 50 U/ml penicillin, pH was adjusted to 7.2 with NaOH. Neuronal cells were dissociated, identified and maintained at 29 °C for 4 h before experiments were carried out<sup>27</sup>.

**Electrophysiological recordings.** Steady-state and voltage-gated ionic currents (voltage-clamp mode) were recorded by using the patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration. Membrane potential was recorded under current-clamp mode. Signals were recorded with an Axopatch 200 A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA), filtered at 5 kHz using a 4-pole lowpass Bessel filter. Ionic currents were displayed on a computer with software control pClamp (version 10.0; Molecular Devices) connected to a digitizer (DIGIDATA 1322; Molecular Devices). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass capillary tubes (GC 150T-10; Clark Electromedical Instruments, Harvard Apparatus) using a Sutter P-97 (Sutter Instruments). Pipettes had resistances ranging from 5 to 7 MΩ when filled with internal pipette solution. The liquid junction potential between bath and internal solution was always corrected before the formation of a gigaohm seal (>2 GΩ).

To record steady-state cholinergic agonist-induced ionic currents, cells were voltage-clamped at a steady-state holding potential of –50 mV (except when otherwise stated). To study the voltage-gated calcium currents, mosquito neurons were voltage-clamped at a steady-state holding potential of –50 mV and calcium currents were elicited by 10-ms depolarizing test pulses to 0 mV from the holding potential at a frequency of 0.1 Hz to minimize the rundown of calcium currents. Although leak and capacitive currents were compensated electronically at the beginning of each experiment, subtraction of residual capacitive and leakage currents was performed with an on-line P/4 protocol provided by pClamp. In this procedure, currents elicited by four subpulses from the holding potential with an amplitude one-fourth of the main experimental pulse were added together to compute capacitance and leak-subtracted currents. For the voltage-gated sodium currents, isolated neurons were voltage-clamped at a steady-state holding potential of –90 mV and 4-ms depolarizing test pulses were applied from the holding potential at a frequency of 0.5 Hz. Capacitive currents were compensated electronically at the beginning of each experiment, subtraction of residual capacitive and leakage currents was performed with an on-line P/6 protocol provided by pClamp.



**Solutions and drug applications.** For steady-state cholinergic agonist-induced ionic currents (voltage-clamp mode) and membrane potential (current-clamp mode), bath solution superfusing the neuronal cell bodies contained 130 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH was adjusted to 7.2 with NaOH. When the experiments were carried out in calcium-free conditions, CaCl<sub>2</sub> was removed and compensated with MgCl<sub>2</sub>. Patch pipettes were filled with solution containing 130 mM K-Gluconate, 10 mM K-Fluoride, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM EGTA, 1 mM ATP-Mg, 10 mM HEPES, pH was adjusted to 7.2 with KOH.

For the voltage-gated calcium currents, the solutions used were designed to eliminate interference from outward potassium currents by the combination of external tetraethylammonium chloride (TEA-Cl) and 4-aminopyridine (4-AP) and by isotonically substituting potassium with cesium in the patch electrode. Inward sodium current was abolished by omitting NaCl (NaCl was replaced with choline chloride)<sup>27</sup>. The extracellular solution superfusing the cells contained 100 mM Choline chloride, 2.5 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES, 5 mM 4-AP, pH was adjusted to 7.2 with NaOH. Patch pipettes were filled with an internal solution containing 140 mM CsCl, 7 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.5 mM EGTA, 10 mM HEPES, 3 mM ATP-Mg, pH was adjusted to 7.2 with KOH.

For the voltage-gated sodium currents, the solutions used were designed to eliminate interference from both outward potassium and inward calcium currents. Bath solution superfusing the cells contained 130 mM NaCl, 50 mM TEA-Cl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM CdCl<sub>2</sub>, 5 mM 4-AP, 10 mM HEPES, pH was adjusted to 7.2 with NaOH 1 M. Patch pipettes were filled with an internal solution containing 140 mM CsCl, 7 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 10 mM HEPES, 1 mM ATP-Mg, pH was adjusted to 7.2 with CsOH 1 M<sup>27</sup>.

Cholinergic agonists (pulse application 3 s in duration, except when otherwise stated) and pharmacological agents (added to the external solutions) used in the different experiments were applied by a gravity perfusion valve controller system (VC-6 M, Harvard apparatus) controlled by pClamp software (flow rate of perfusion 0.5 mL/min). The perfusion tube was placed within 10 μm from the isolated neuron cell body. When necessary, some compounds were prepared in DMSO and then diluted in the bath solution to obtain the different concentrations tested. The highest concentration used in the electrophysiological recordings of DMSO was 0.1%. This concentration of solvent was not found to have any effect on the electrophysiological properties of neuron cell body. All compounds were purchased from Sigma Chemicals (L'isle d'Abeau Chesnes, France). Patch-clamp experiments were conducted at room temperature (20–22 °C).

**Electrophysiology data analysis.** The equations used to fit the monophasic (Kis neurons, Eq. 1, consisting of a single Hill equation) and biphasic (AcerKis neurons, Eq. 2, constituted by the sum of two Hill equations) concentration-response curves for ACh were:

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + \left(\frac{EC50}{x}\right)^{nH1}} \quad (1)$$

$$I = I_{\max} / \left( \frac{\alpha 1}{1 + \left(\frac{EC50_1}{x}\right)^{nH1}} + \frac{1 - \alpha 1}{1 + \left(\frac{EC50_2}{x}\right)^{nH2}} \right) \quad (2)$$

where  $I_{\max}$  is the maximal current amplitude and  $x$  is the agonist concentration,  $EC50_1$  and  $EC50_2$  are the concentrations of ACh that gives half-maximal response,  $nH_1$ , and  $nH_2$  are the Hill coefficient and  $\alpha_1$  is the fraction of receptors that have an affinity described by  $EC50_1$ .

Charge entry was calculated from the integral of the current according to the Eq. (3):

$$CE = \frac{1}{zF} \int I t \quad (3)$$

where CE is the charge entry,  $z$  is the ion elementary charge,  $F$  is the Faraday constant,  $I$  is the inward current and  $t$  is the time.

The whole-cell patch-clamp technique in voltage-clamp mode was applied to monitor changes in Cm. The decay phase of the transient was well-fitted with a single exponential (Eq. 4) or by the sum of two exponentials (Eq. 5):

$$I_c = A0.e^{-t/\tau} \quad (4)$$

$$I_c = A1.e^{-t/\tau_1} + A2.e^{-t/\tau_2} \quad (5)$$

where  $I_c$  is the capacitive current,  $A0$ ,  $A1$  and  $A2$  are the corresponding relative current amplitude with time constants  $\tau$ ,  $\tau_1$  and  $\tau_2$ .

The voltage-dependence of the conductances was calculated as a function of the membrane potential according to Eq. (6) and was fitted according to the Boltzmann Eq. (7):

$$G = \frac{I}{(V_m - E_x)} \quad (6)$$

$$\frac{G}{G_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{(V_{1/2} - V_m)/k}} \quad (7)$$

where  $I$  is the inward current amplitude,  $V_m$  is the potential at which the membrane is clamped and  $E_x$  is the equilibrium potential for a given ion. For the voltage-gated sodium current, the conductance-voltage relationship was best fitted according to a double Boltzmann Eq. (8):

$$\frac{G}{G_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{(V_{1/2} - V_m)/k1}} + \frac{1}{1 + e^{(V_{2/2} - V_m)/k2}} \quad (8)$$

where  $G$  is the sodium conductance,  $G_{\max}$  is the maximal conductance from a holding potential of  $-90$  mV,  $V_m$  is the membrane potential applied,  $V_{1/2}$  is the potential at which half the sodium channels are activated and  $k$  is the slope factor. Conductance-voltage relationships were fit for each individual cell.

The inactivation curve, obtained by plotting the amplitude of the peak current against the conditioning potential was best fitted according to the Boltzmann distribution (9):

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{1}{1 + e^{(V_m - V_{1/2})/k}} \quad (9)$$

where  $I$  is the peak current,  $I_{\max}$  is the maximal peak current from a holding potential of  $-90$  mV,  $V_{1/2}$  is the potential at which half current was inactivated,  $V_m$  is the potential of the conditioning pulse and  $k$  is the slope factor.

**Statistics and reproducibility.** Data analysis and fitting procedures were performed with Prism v8 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA). Data are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. When data followed a normal distribution, significant differences were assessed with Student  $t$ -tests for multiple comparisons. In other cases, significant differences were assessed with Mann-Whitney tests. For biochemical assay of acetylcholinesterase activity, the statistical analysis was made by using Analysis of Variance (one-way ANOVA). Statistical analysis was expressed as non-significant for  $p > 0.05$  and significant for  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$ .

**Calcium imaging.** Neurons were isolated, as already mentioned above. The cells were washed two times in saline and incubated in the dark with 2 μM Fura-2 pentakis (acetoxy-methyl) ester (Fura-2 AM) for 40 min at 29 °C. After loading, cells were washed two times in saline. The glass coverslips were then mounted in a recording chamber (Warner Instruments, Hamden, CT, USA) connected to a gravity perfusion system allowing drug application. Imaging experiments were performed with an inverted Nikon Eclipse Ti microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with epifluorescence. Excitation light was provided by a 75-W integral xenon lamp. Excitation wavelengths (340 nm and 380 nm) were applied using a Lambda DG4 wavelength switcher (Sutter instrument, Novato, CA, USA). Images were collected with an Orca-R2 CCD camera (Hamamatsu photonics, Shizuoka, Japan) and recorded on the computer with Imaging Workbench software (version 6, Indec BioSystems Santa Clara, CA, USA). Experiments were carried out at room temperature. Intracellular calcium level was expressed as the ratio of emitted fluorescence (340/380 nm).

**Biochemical assay of acetylcholinesterase activity.** Neuronal Acetylcholinesterase (AChE) activity was determined according to the spectrophotometric method previously described<sup>75</sup>. The AChE source was the isolated neuronal cells (10 heads from *Kisumu* or *AcerKis An. gambiae* dissociated in 1 mL of the mosquito saline buffer containing: 130 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 50 mM sucrose, 5% fetal bovine serum, 50 μg/mL streptomycin et 50 U/mL penicillin, pH was adjusted to 7.2 with NaOH. Biochemical assays were carried out using 90 μL of AChE source, 100 μL of 1 mM acetylthiocholine iodide (ATC) (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) and 100 μL of 1 mM dithio-dinitrobenzoate (DTNB) (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). After 2 h of color development, the reaction was monitored at 405 nm, with a Bio-Tek EL808 Ultra Microplate reader (Biotek Instruments). The AChE activity from *AcerKis* neuronal cells was expressed as relative activity compared to *Kis* one. Data were analyzed with GraphPad Prism v8 (GraphPad software, Inc) and displayed as mean  $\pm$  S.E.M.

**Transcriptional analysis by RT-qPCR.** Neuronal cells were dissociated from 10 emerging females mosquito heads. Neuronal suspension was aspirated to remove cell debris and centrifuged at 13,000 g for 10 min. Pellets were stored at  $-80$  °C until use. Total RNA were extracted from frozen pellets with Nucleospin<sup>®</sup> RNA Plus kit (Macherey Nagel) and eluted in 60 μL of RNase- and DNase-free water. The total mRNA was precipitated with glycogen, sodium acetate and ethanol at  $-80$  °C overnight. The pellet resulting from centrifugation (12,000 g for 15 min at 4 °C) was washed twice with 75% ethanol, air dried, resuspended in 20 μL water. The first-strand cDNA was synthesized in 20 μL reaction volumes using 1.5 μg of total RNA, 500 ng of oligo(dT) primers and the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Quantitative real-time

PCR was performed in 20  $\mu$ L reaction volumes with MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR<sup>®</sup> Assay I Low ROX (Eurogentec), 1  $\mu$ M of primers and 5  $\mu$ L of 1:20 diluted cDNA. Reactions were run on a CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-rad) using the following program: initial step at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 62 °C for 30 s and 72 °C for 1 min. After the PCR reactions were complete, melt curve analyses were carried out. Four replicates were obtained for each strain. The expression level of  $Ca_v1$ , the  $\alpha 1$  subunit of the voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel, gene was normalized to the expression level of *rps7* or *actin* reference genes and relative expression levels were calculated according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method<sup>76</sup>. Primers are indicated in Supplementary Table 2. The PCR efficiencies were over 94%, which is acceptable for reliable real-time PCR quantification. For statistical analysis, one-way ANOVA was performed with 95% confidence intervals using GraphPad Prism v8.

**Larval bioassays.** The bioassays were carried out using clothianidin prepared in absolute ethanol and stored at 4 °C throughout the experimentation. Insecticide was serially diluted from a 1000 mg/L stock solution in absolute ethanol in series by transferring 2 mL insecticide solution in 18 mL absolute ethanol. The larval bioassays were performed using a standard protocol described by the World Health Organization<sup>77</sup>. Each bioassay was repeated three to four times using late third- and early fourth-instar larvae of Kis, AcerKis and KdrKis. For each bioassay, 25 larvae of each strain were transferred to cups containing 99 mL of distilled water. For each bioassay, we used four cups per concentration (100 larvae) and seven concentrations of each insecticide in a range between 0 and 100% mortality. One milliliter of clothianidin, at the desired concentration, was added to the cups. Negative controls with 1 mL of absolute ethanol were performed for each test. Each bioassay was maintained at 28 °C. Larval mortality was recorded after 24 h and 48 h exposure. Tetramin<sup>®</sup> fish food powder was added in the cups after 24 h mortality recording. Larval mortality was corrected by the Abbott formula to take into account control mortality (<10%), and data were analyzed by the log-probit method of Finney with the R software using the R script BioRssay<sup>77–80</sup>. The programmed script uses the iterative method of maximum likelihood to fit a linear regression between the logarithm of concentration and the probit of mortality. The goodness-of-fit was estimated by a weighted chi-squared test. It also estimates the lethal concentrations and the slope of the regression lines with their confidence intervals.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

#### Data availability

The accession number used for the RT-qPCR analysis were obtained from GenBank (*rps7* gene, GenBank accession number XM\_314557.3; *actin* gene, GenBank accession number XM\_315271.4; *Cav1* gene, GenBank accession number EF595743.1). All other data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper or the Supplementary Information. All source data generated and analyzed during the current study are available in Supplementary Data 1. Data can also be obtained from the corresponding author upon reasonable request.

Received: 7 January 2021; Accepted: 6 May 2021;

Published online: 02 June 2021

#### References

- World Health Organization. Annex 1. Global burden of major vector-borne diseases, as of March 2017. (2017). <https://doi.org/10.1001/jama.2013.278331>
- World Health Organization. *Malaria report 2018*. (2018).
- World Health Organization. *World malaria report 2019*. WHO Regional Office for Africa (2019).
- Ranson, H. Current and future prospects for preventing malaria transmission via the use of insecticides. *Cold Spring Harbor Perspect. Med.* **7**, a026823 (2017).
- Liu, N. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* **60**, 537–559 (2015).
- Adolfi, A. et al. Functional genetic validation of key genes conferring insecticide resistance in the major African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **116**, 25764–25772 (2019).
- Minetti, C., Ingham, V. A. & Ranson, H. Effects of insecticide resistance and exposure on Plasmodium development in Anopheles mosquitoes. *Curr. Opin. Insect Sci.* **39**, 42–49 (2020).
- Lapied, B., Pennetier, C., Apaire-Marchais, V., Licznar, P. & Corbel, V. Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends Biotechnol.* **27**, 190–198 (2009).
- Casida, J. E. & Durkin, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 99–117 (2013).
- Silva, A. P. B., Santos, J. M. M. & Martins, A. J. Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelins and their association with resistance to pyrethroids - a review. *Parasites Vectors* **7**, 1–14 (2014).
- Zalucki, M. P. & Furlong, M. J. Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence. *Curr. Opin. Insect Sci.* **21**, 19–25 (2017).
- Balabanidou, V., Grigoraki, L. & Vontas, J. Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Curr. Opin. Insect Sci.* **27**, 68–74 (2018).
- Gatton, M. L. et al. The importance of mosquito behavioural adaptations to malaria control in Africa. *Evolution* **67**, 1218–1230 (2013).
- Killeen, G. F. & Chitnis, N. Potential causes and consequences of behavioural resilience and resistance in malaria vector populations: a mathematical modelling analysis. *Malar. J.* **13**, 97 (2014).
- Mulati, M. et al. Effect of DEET-multiple exposures on behavior and life history traits in the malaria mosquito *Anopheles gambiae* (s.s.). *Parasites Vectors* **11**, 432 (2018).
- Mulati, M. et al. Efficacy of vector control tools against malaria-infected mosquitoes. *Sci. Rep.* **9**, 6664 (2019).
- Carrasco, D. et al. Behavioural adaptations of mosquito vectors to insecticide control. *Curr. Opin. Insect Sci.* **34**, 48–54 (2019).
- Pignatelli, P. et al. The *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter family: phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* **27**, 110–122 (2018).
- Isaacs, A. T., Mawejje, H. D., Tomlinson, S., Rigden, D. J. & Donnelly, M. J. Genome-wide transcriptional analyses in *Anopheles* mosquitoes reveal an unexpected association between salivary gland gene expression and insecticide resistance. *BMC Genomics* **19**, 225 (2018).
- Ingham, V. A., Wagstaff, S. & Ranson, H. Transcriptomic meta-signatures identified in *Anopheles gambiae* populations reveal previously undetected insecticide resistance mechanisms. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
- Ingham, V. A. et al. A sensory appendage protein protects malaria vectors from pyrethroids. *Nature* **577**, 376–380 (2020).
- Basha, E., O'Neill, H. & Vierling, E. Small heat shock proteins and  $\alpha$ -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochemical Sci.* **37**, 106–117 (2012).
- Vieira, F. G. & Rozas, J. Comparative genomics of the odorant-binding and chemosensory protein gene families across the arthropoda: Origin and evolutionary history of the chemosensory system. *Genome Biol. Evol.* **3**, 476–490 (2011).
- French-Constant, R. H., Williamson, M. S., Davies, T. G. E. & Bass, C. Ion channels as insecticide targets. *J. Neurogenet.* **30**, 163–177 (2016).
- Weill, M. et al. The unique mutation in *ace-1* giving high insecticide. *Insect Mol. Biol.* **13**, 1–7 (2004).
- Carlier, P. R., Bloomquist, J. R., Totrov, M. & Li, J. Discovery of species-selective and resistance-breaking anticholinesterase insecticides for the malaria mosquito. *Curr. Med. Chem.* **24**, 2946 (2017).
- Lavialle-Defaix, C. et al. *Anopheles gambiae* mosquito isolated neurons: a new biological model for optimizing insecticide/repellent efficacy. *J. Neurosci. Methods* **200**, 68–73 (2011).
- Thany, S. H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D. B. & Lapied, B. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 14–22 (2007).
- Sine, S. M., Strikwerda, J. R. & Mazzaferro, S. Structural basis for  $\alpha$ -bungarotoxin insensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **160**, 107660 (2019).
- Alout, H., Djoghbenou, L., Berticat, C., Chandre, F. & Weill, M. Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetylcholinesterase 1 biochemical properties. (2008). <https://doi.org/10.1016/j.chpb.2008.03.008>
- Assogba, B. S. et al. Phenotypic effects of concomitant insensitive acetylcholinesterase (*ace-1(R)*) and knockdown resistance (*kdr(R)*) in *Anopheles gambiae*: a hindrance for insecticide resistance management for malaria vector control. *Parasit. Vectors* **7**, 548 (2014).
- Bodereau-Dubois, B. et al. Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **341**, 326–339 (2012).
- Leyton, V., Goles, N. I., Fuenzalida-Urbe, N. & Campusano, J. M. Octopamine and dopamine differentially modulate the nicotine-induced calcium response in *Drosophila* mushroom body kenyon cells. *Neurosci. Lett.* **560**, 16–20 (2014).
- Moreau, E. et al. Orthosteric muscarinic receptor activation by the insect repellent IR3535 opens new prospects in insecticide-based vector control. *Sci. Rep.* **10**, 1–15 (2020).
- Grolleau, F. & Lapied, B. Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J. Exp. Biol.* **203**, 1633–1648 (2000). **Pt 11**.



36. Shen, J. X. & Yakel, J. L. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol. Sin.* **30**, 673–680 (2009).
37. Wicher, D., Walther, C. & Wicher, C. Non-synaptic ion channels in insects — basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog. Neurobiol.* **64**, 431–525 (2001).
38. Subramanian, G. et al. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 129–149 (2002).
39. Mongin, E., Louis, C., Holt, R. A., Birney, E. & Collins, F. H. The *Anopheles gambiae* genome: an update. *Trends Parasitol.* **20**, 49–52 (2004).
40. Jones, A. K., Grauso, M. & Sattelle, D. B. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* **85**, 176–187 (2005).
41. Ngwej, L. M. et al. Indoor residual spray bio-efficacy and residual activity of a clothianidin-based formulation (SumiShield® 50WG) provides long persistence on various wall surfaces for malaria control in the Democratic Republic of the Congo. *Malar. J.* **18**, 72 (2019).
42. Fongnikin, A. et al. Efficacy of Fludora® Fusion (a mixture of deltamethrin and clothianidin) for indoor residual spraying against pyrethroid-resistant malaria vectors: Laboratory and experimental hut evaluation. *Parasites Vectors* **13**, 466 (2020).
43. Casida, J. E. Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: progress and prospects. *Annu. Rev. Entomol.* **63**, 125–144 (2018).
44. Matsuda, K., Ihara, M. & Sattelle, D. B. Neonicotinoid insecticides: molecular targets, resistance, and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 241–255 (2020).
45. Cheung, J., Mahmood, A., Kalathur, R., Liu, L. & Carlier, P. R. Structure of the G119S mutant acetylcholinesterase of the malaria vector *Anopheles gambiae* reveals basis of insecticide resistance. *Structure* **26**, 130–136.e2 (2018).
46. Alout, H. & Weill, M. Amino-acid substitutions in acetylcholinesterase 1 involved in insecticide resistance in mosquitoes. *Chem. Biol. Interact.* **175**, 138–141 (2008).
47. Hue, B. & Callec, J.-J. Electrophysiology and pharmacology of synaptic transmission in the central nervous system of the cockroach. in *Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research* 149–168 (CRC Press, 1990). <https://doi.org/10.1201/9781351070751-9>
48. Corbel, V. et al. Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *Neurotoxicology* **27**, 508–519 (2006).
49. Thany, S. H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D. B. & Lapiéd, B. Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 14–22 (2007).
50. Quick, M. W. & Lester, R. A. J. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J. Neurobiol.* **53**, 457–478 (2002).
51. Dani, J. A. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor structure and function and response to nicotine. *Int. Rev. Neurobiol.* **124**, 3–19 (2015).
52. Jarvis, G. E. & Thompson, A. J. Evidence for an effect of receptor density on ligand occupancy and agonist EC<sub>50</sub>. *Sci. Rep.* **9** (2019).
53. Giniatullin, R., Nistri, A. & Yakel, J. L. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci.* **28**, 371–378 (2005).
54. Lee, A. M. et al. PKC $\epsilon$  phosphorylates  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic ACh receptors and promotes recovery from desensitization. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 4430–4441 (2015).
55. Rinkevich, F. D., Du, Y. & Dong, K. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic. Biochem. Physiol.* **106**, 93–100 (2013).
56. Dong, K. et al. Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **50**, 1–17 (2014).
57. Scott, J. G. Life and death at the voltage-sensitive sodium channel: evolution in response to insecticide use. *Annu. Rev. Entomol.* **64**, 243–257 (2019).
58. Du, Y., Nomura, Y., Zhorov, B. & Dong, K. Sodium channel mutations and pyrethroid resistance in *Aedes aegypti*. *Insects* **7**, 60 (2016).
59. Vais, H. et al. Functional analysis of a rat sodium channel carrying a mutation for insect knock-down resistance (*kdr*) to pyrethroids. *FEBS Lett.* **413**, 327–332 (1997).
60. Vais, H. et al. Activation of *Drosophila* sodium channels promotes modification by deltamethrin: Reductions in affinity caused by knock-down resistance mutations. *J. Gen. Physiol.* **115**, 305–318 (2000).
61. Soderlund, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. in *Pest Management Science* **64**, 610–616 (John Wiley & Sons, Ltd, 2008).
62. Burton, M. J. et al. Differential resistance of insect sodium channels with *kdr* mutations to deltamethrin, permethrin and DDT. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 723–732 (2011).
63. Wang, L. et al. A mutation in the intracellular loop III/IV of mosquito sodium channel synergizes the effect of mutations in helix IIS6 on pyrethroid resistance. *Mol. Pharmacol.* **87**, 421–429 (2015).
64. Wicher, D., Walther, C. & Wicher, C. Non-synaptic ion channels in insects - Basic properties of currents and their modulation in neurons and skeletal muscles. *Prog. Neurobiol.* **64**, 431–525 (2001).
65. Dolphin, A. C. & Lee, A. Presynaptic calcium channels: specialized control of synaptic neurotransmitter release. *Nat. Rev. Neurosci.* **21**, 213–229 (2020).
66. Jones, A. K. & Sattelle, D. B. Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Adv. Exp. Med. Biol.* **683**, 25–43 (2010).
67. Raymond, V., Goven, D., Benzidane, Y., List, O. & Lapiéd, B. Influence of cellular and molecular factors on membrane target sensitivity to insecticides. *Curr. Med. Chem.* **24**, 2974–2987 (2017).
68. Calas-List, D., List, O., Quinchard, S. & Thany, S. H. Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin action through activation of  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors. *Neurotoxicology* **37**, 127–133 (2013).
69. List, O. et al. Inhibition of PaCaMKII-E isoform in the dorsal unpaired median neurosecretory cells of cockroach reduces nicotine- and clothianidin-induced currents. *J. Neurochem.* **130**, 507–513 (2014).
70. Caballero, J. P. et al. Nanoencapsulated deltamethrin as synergistic agent potentiates insecticide effect of indoxacarb through an unusual neuronal calcium-dependent mechanism. *Pestic. Biochem. Physiol.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.pestibp.2019.03.014>
71. El-Adouzi, M., Apaire-Marchais, V., Raymond, V. & Lapiéd, B. New insecticide composition. Patent 16674692 (2020).
72. Djogbénu, L. et al. Characterization of insensitive acetylcholinesterase (*ace-1<sup>R</sup>*) in *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae): Resistance levels and dominance. *J. Med. Entomol.* **44**, 805–810 (2017).
73. Martínez-Torres, D. et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s. s. *Insect Mol. Biol.* **7**, 179–184 (1998).
74. Alout, H. et al. Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS ONE* **8**, e63849 (2013).
75. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88–95 (1961).
76. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 45e (2001).
77. World Health Organization. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *World Heal. Organ.* 1–41 (2005).
78. Abbott, W. S. A methode for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* **18**, 265–267 (1925).
79. Finney, D. J. Probit Analysis. *J. Pharm. Sci.* **60**, 1432 (1971).
80. Milesi P., Pocquet N. & Labbé P. BioRssay: a R script for bioassay analyses. <https://drive.google.com/file/d/1qMNC2EQlxBnOunuaa1BCQcLesnrFX/view>

#### Acknowledgements

S.P. was supported by a doctoral fellowship of the Direction Générale de l'Armement, l'Agence de l'Innovation de Défense (Ministère des Armées) and the Région Pays de la Loire (France). We thank the Vectopole platform (IRD, Montpellier), B. Scheid for providing technical support and C. Gimbre for the rearing and maintenance of the mosquito populations). The Vectopole is a platform of the 'Vectopole Sud' Network and is part of the LabEx CeMEB (ANR-10-LABX-04-01).

#### Author contributions

S.P., E.M., C.D., D.G., M.E.-A., F.C. and B.L. contributed to the collection and analysis of the data. C.D., S.P. designed and performed molecular biology experiments. S.P. and F.C. performed larval bioassays. S.P., F.C. and B.L. wrote the paper. All authors read and edited the paper.

#### Competing interests

The authors declare no competing interests.

#### Additional information

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02192-0>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to B.L.

**Reprints and permission information** is available at <http://www.nature.com/reprints>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

**Titre :** Etude des mécanismes de compensation moléculaires et cellulaires associés aux résistances *ace-1<sup>R</sup>* et *kdr* pour l'optimisation d'une stratégie de lutte contre les moustiques vecteurs d'agents pathogènes.

**Mots clés :** *Anopheles gambiae* – Résistance – Mécanismes de compensation – Récepteur cholinergique nicotinique – Insecticide – Agent synergisant

**Résumé :** De nos jours, la lutte anti-vectorielle s'appuie principalement sur l'utilisation des insecticides. Cependant, l'apparition de résistances au sein des populations de moustiques réduit l'efficacité de ces molécules. A l'aide d'une approche multidisciplinaire réalisée *in vitro* sur des neurones isolés de trois souches de moustiques *Anopheles gambiae*, une souche sensible (Kis) et deux souches résistantes aux insecticides de type organophosphorés/carbamates (AcerKis) et pyréthroïdes (KdrKis), il a été possible de montrer pour la première fois qu'il existe des mécanismes de compensation cellulaires et moléculaires associés aux résistances *ace-1<sup>R</sup>* sur l'acétylcholinestérase et *kdr* sur le canal sodium dépendant du potentiel. Ces mécanismes doivent être considérés pour adapter des stratégies de lutte chimique car ils affectent les propriétés

électropharmacologiques des récepteurs cholinergiques de type nicotinique. Ils modulent l'effet de l'acétylcholine, le neurotransmetteur endogène, mais aussi de la clothianidine, un insecticide néonicotinoïde agoniste de ces récepteurs. Au contraire, l'effet du triflumézopyrime, un insecticide mésoionique antagoniste compétitif de ces récepteurs ne semble pas affecté par ces mécanismes de compensation. Cette étude a été complétée par des tests toxicologiques comparatifs réalisés *in vivo* sur les larves de ces trois souches. Les effets de la clothianidine et du triflumézopyrime ont été testés seuls et associés au répulsif IR3535, utilisé comme agent synergisant pour optimiser l'efficacité du traitement. Les deux associations ont montré un effet synergique fort, justifiant l'intérêt de les proposer comme nouvelles stratégies de lutte.

**Title :** Study of molecular and cellular compensation mechanisms associated with *ace-1<sup>R</sup>* and *kdr* resistances for the optimization of a vector control strategy

**Keywords :** *Anopheles gambiae* – Resistance – Compensatory mechanisms – Nicotinic acetylcholine receptors – Insecticide – Synergistic agent

**Abstract :** Nowadays, vector control is mainly based on the use of insecticides. However, the emergence of resistance within mosquito populations reduces the effectiveness of these molecules. Using a multidisciplinary approach carried out *in vitro* on neurons isolated from three strains of *Anopheles gambiae* mosquitoes, one sensitive strain (Kis) and two strains resistant to organophosphate/carbamate (AcerKis) and pyrethroid (KdrKis) insecticides, we showed for the first time that some cellular and molecular compensatory mechanisms are associated with *ace-1<sup>R</sup>* resistance on acetylcholinesterase and *kdr* resistance on the potential-dependent sodium channel. These mechanisms must be considered to adapt chemical control strategies because they affect

the electropharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors. They modulate the effect of acetylcholine, the endogenous neurotransmitter, but also of clothianidin, a neonicotinoid insecticide agonist of these receptors. On the contrary, the effect of triflumezopyrim, a mesoionic insecticide competitive antagonist of these receptors does not seem to be affected by these compensatory mechanisms. This study was completed by comparative toxicological tests carried out *in vivo* on the larvae of these three strains. The effects of clothianidin and triflumezopyrim were tested alone and in combination with the repellent IR3535, which was used as a synergistic agent to optimize treatment efficacy. Both combinations showed a strong synergistic effect, justifying the interest to propose them as new control strategies.