

Le paradoxe répulsif en Santé Publique : Peut-on recommander des composés à mode d'action inconnu pour se protéger des insectes nuisants et vecteurs de maladies ?

Bruno Lapied¹, Céline Lavialle-Defaix¹, Maria Stankiewicz², Cédric Pennetier³, Didier Fournier⁴ et Vincent Corbel³

1.Laboratoire RCIM UPRES EA 2647/USC INRA 2023/IFR149QUASAV, Université d'Angers, Angers, France

2.Institute of General & Molecular Biology, N. Copernicus University, Torun, Poland

3.IRD/Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou, Cotonou, République du Bénin

4.CNRS Groupe de Biotechnologie des protéines, Université de Toulouse, Toulouse, France

Bruno Lapied : Professeur, bruno.lapied@univ-angers.fr

Céline Lavialle-Defaix : Chercheur post-doctoral, celine_defaix@yahoo.fr

Maria Stankiewicz : Professeur, stankiew@umk.pl

Cédric Pennetier : CR2 IRD, cedric.pennetier@ird.fr

Didier Fournier : Professeur, Didier.Fournier@ipbs.fr

Vincent Corbel : CR1 IRD, vincent.corbel@ird.fr

Objectifs, enjeux et problématique

Ces 30 dernières années ont vu la résurgence dramatique de maladies infectieuses de toutes sortes, particulièrement celles à transmission vectorielle. Environ 3.2 milliards de personnes vivent dans des zones à risques du paludisme et 350 à 500 millions d'épisodes cliniques et environ 1 million de décès sont répertoriés chaque année (WHO, 2005). La dengue continue d'être l'arbovirose la plus répandue avec plus de 100 pays concernés et environ 2 à 3 milliards de personnes situées dans les zones à risques. L'épidémie récente liée au virus du chikungunya dans l'Océan Indien souligne les risques croissants de voir émerger/ré-émerger des maladies à transmission vectorielle en différents points du globe.

Historiquement, les stratégies utilisées pour réduire l'incidence des maladies à transmission vectorielle ont porté sur l'élimination ou le contrôle des populations de vecteurs (par des moyens chimiques et biologiques) et sur la protection personnelle principalement sous forme de substances répulsives. Depuis la deuxième guerre mondiale, l'utilisation des répulsifs a considérablement augmenté avec la découverte de molécules de synthèse telle que le DEET. Environ 200 millions de personnes utilisent du DEET chaque année pour se protéger contre les insectes et plus de 8 milliards d'applications ont été réalisées au cours des 40 dernières années. Récemment, de nouvelles substances actives, IR3535, KBR 3023, et PMD, ont été commercialisées et ont montré des performances comparables à celles du DEET sur les insectes nuisants et/ou vecteurs de maladies.

Malgré l'intérêt grandissant de la communauté scientifique à utiliser les répulsifs en santé publique, une question majeure persiste concernant leur mode d'action chez les insectes. Très peu d'informations sont disponibles concernant la toxicité des répulsifs, mais plusieurs rapports relatant les symptômes liés à une exposition prolongée au DEET chez l'homme, les mammifères et/ou les invertébrés, reflètent une action sur le Système Nerveux Central (SNC). Bien que le profil toxicologique du DEET soit favorable, certaines études ont mis en évidence une toxicité du DEET une fois combiné avec d'autres substances actives. Par exemple, les interactions entre le pyridostigmine bromide (un insecticide carbamate utilisé comme agent prophylactique d'exposition aux gaz organophosphorés) et le DEET soulève beaucoup d'interrogations depuis que plusieurs études ont suggéré l'implication de ces deux molécules dans les syndromes de la guerre du Golfe.

Des expériences d'électrophysiologie menées par l'équipe du laboratoire RCIM d'Angers (partenaire I du projet) sur les neurones isolés de blattes (*Periplaneta americana*) ont pu démontrer pour la première fois, une action neurotoxique forte du DEET au niveau du SNC. L'application externe de DEET sur les cellules neurosécrétrices d'insectes maintenues en culture induit une dépolarisation membranaire suivi d'une élévation de la concentration en calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) qui altère fortement les fonctions neuronales et l'activité synaptique de l'insecte.

Dans la mesure où les répulsifs, et en particulier le DEET, occupent une place de plus en plus importante en santé publique, il devient urgent d'identifier les mécanismes par lesquels ce composé i) modifie le comportement de l'insecte, ii) entraîne des mortalités et iii) interagit avec d'autres substances actives telles que les pesticides. Les études que nous proposons de réaliser dans ce domaine apporteront de nouvelles connaissances sur le fonctionnement du système olfactif chez les insectes permettant ainsi une meilleure utilisation des répulsifs en santé publique (*i.e.* utilisation sur la peau ou matériaux imprégnés).

Une meilleure compréhension du mode d'action des répulsifs permettra également d'appréhender les conséquences sub-létales et les effets indésirables de ces composés utilisés seuls ou en association avec des insecticides chez l'homme. De plus ces études permettront aux industriels de développer de nouvelles molécules plus sûres et plus efficaces vis-à-vis des insectes nuisants et/ou vecteurs de maladies. Enfin, les connaissances générées par ce projet serviront de plate-forme permettant d'étudier les bases génétiques et moléculaires de la transduction des signaux olfactifs chez les moustiques, qui sont susceptibles de constituer de nouvelles cibles pour les insecticides à l'avenir.

En résumé, ce projet porte sur l'étude des modifications comportementales et physiologiques induites par les répulsifs chez les insectes, la détermination des cascades d'événements neurophysiologiques et biochimiques impliquées dans le mode d'action de ces composés et l'identification de leurs effets secondaires sur le système nerveux central des insectes et des mammifères.

Matériels et méthodes

L'originalité de ce programme REAC réside dans l'approche multidisciplinaire complémentaire bidimensionnelle (laboratoire et terrain) des techniques utilisées. Les résultats obtenus *in vitro* en laboratoire sur des préparations cellulaires d'insecte (neurones en culture ou préparation synaptique), moléculaires (enzymes purifiées) et sur moustiques *in vivo* ont également été confirmés sur le terrain en situation réelle.

Matériels biologiques

Les insectes :

- la blatte *Periplaneta americana* (modèle de référence utilisé pour étudier *in vitro* les effets des répulsifs et des insecticides sur préparations cellulaires et moléculaires synaptique et extra-synaptique,
- la drosophile (*Drosophila melanogaster*) pour la purification de l'acétylcholinestérase,
- les moustiques *Anopheles gambiae* et *Aedes aegypti* pour tous les tests *in vivo*

Méthodes expérimentales

Les études réalisées pour étudier les effets de 4 répulsifs (DEET, IR3535, KBR 3023 et citriodiol) sur moustiques *in vivo* peuvent se séparer en deux groupes :

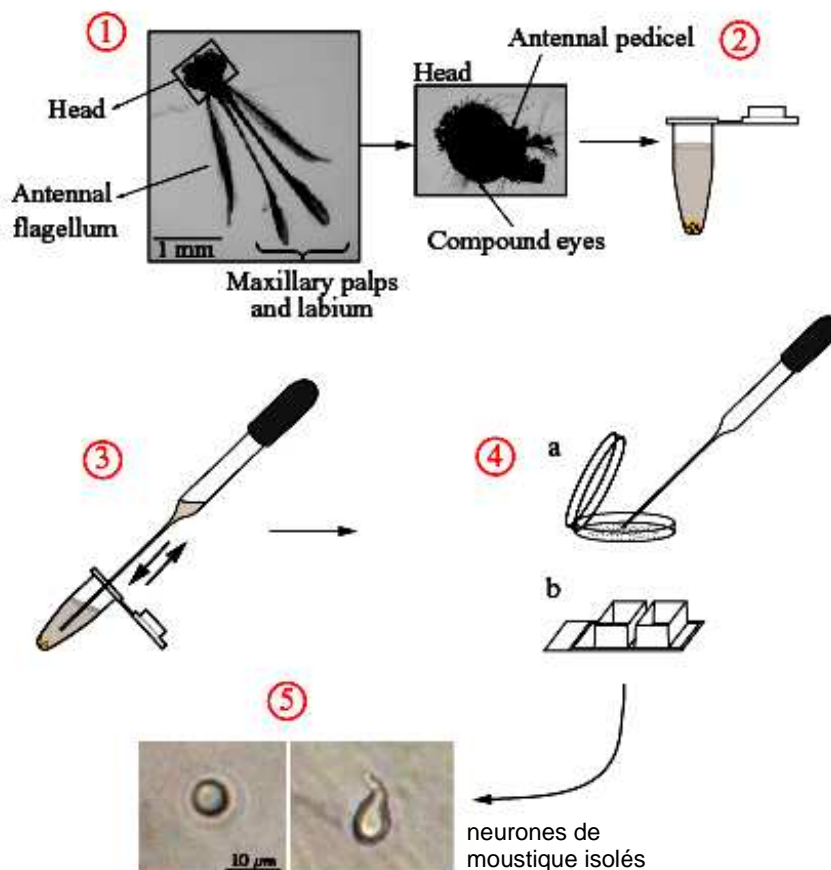
- Etudes de laboratoire (bio-essais, chambre de vols)
- Etudes de terrain (cases expérimentales)

Les études permettant d'identifier les cibles cellulaires et moléculaires du DEET (répulsif le plus utilisé dans le monde) regroupent un ensemble de technique expérimentales :

- Culture de neurones d'insecte en conditions stériles
- Electrophysiologie cellulaire (technique de patch-clamp, configuration cellule entière) et synaptique (technique de simple oil-gap pour étudier la transmission synaptique cholinergique)
- Imagerie calcique (méthode spatio-temporelle ratiométrique avec comme sonde fluorescente utilisée le Fura-2)
- Purification d'enzyme comme l'acétylcholinestérase de drosophile et humaine avec caractérisation de la cinétique d'inhibition en présence de répulsifs et d'insecticides
- Biologie moléculaire (RT-PCR sur neurones de moustiques isolés, clonages, séquençages du canal sodium, des isoformes de l'acétylcholinestérase etc...)
- Double marquage immunocytochimique (acridine orange et HRP) pour identifier les neurones de moustiques parmi les cellules obtenus après dissociation
- Microscopie confocale

Cas particulier – neurones de moustiques (*A. gambiae*) maintenus en culture

L'un des aspects innovants du programme REAC consistait à mettre au point, et ceci pour la première fois, une technique de culture de neurones de moustiques (*A. gambiae*) pour étudier directement les effets des répulsifs et des insecticides utilisés en lutte anti-vectorielle.



Cette technique est maintenant au point et adaptée à différents protocoles comme l'électrophysiologie (patch-clamp) et la biologie moléculaire comme la RT-PCR single cell)

Remarque :

Compte tenu de la diversité des approches expérimentales utilisées et pour ne pas alourdir la rubrique « Matériels et Méthodes », les informations détaillées sur les procédures expérimentales utilisées sont disponibles dans les rubriques « materials and methods » de chaque publications scientifiques citées ci-dessous.

Principaux résultats

La densité des résultats obtenus dans le cadre du programme REAC est très importante (attestée par 6 publications en 3 ans citées ci-dessous). Les principaux faits marquants peuvent se résumer ainsi :

- Détermination de l'activité intrinsèque des répulsifs sur *An. gambiae* et *Ae. aegypti*
- Caractérisation de l'efficacité des mélanges répulsifs - insecticides et étude de leurs interactions
 - *Etude des interactions entre DEET et Carbamates chez les moustiques vecteurs*
 - *Inhibition des oxydases*
 - *Inhibition des estérases*
- Caractérisation de l'efficacité des moustiquaires imprégnées de mélanges d'insecticides organophosphorés et de répulsifs contre *An.gambiae*
 - *Interactions entre le pyrimiphos-méthyl et les répulsifs, DEET et KBR sur tulle moustiquaire contre An. gambiae*
 - *Efficacité comparée des mélanges PM/DEET et PM/KBR, avec une formulation standard de deltaméthrine contre An. gambiae résistant aux insecticides, Burkina Faso.*
 - *Impact des mélanges PM/DEET et PM/KBR, sur le comportement des moustiques vecteurs de paludisme en zone de résistance aux insecticides.*
- Identification des cibles (i. e., acétylcholinestérase) et mode d'action du DEET sur la physiologie des insectes
- Mise au point d'une nouvelle technique de culture de neurones de moustiques (*A. gambiae*) et développement des techniques d'électrophysiologie et de biologie moléculaire.

Pour cette dernière partie, un protocole de dissociation et de culture à court-terme de neurones prélevés des têtes de moustiques d'*A. gambiae* a été mis au point pour adapter des techniques électrophysiologique de patch-clamp (configuration cellule entière) et de biologie moléculaire (RT-PCR single cell). Cette étape expérimentale était nécessaire afin de confirmer que ces neurones, une fois en culture, exprimaient bien les cibles classiques des répulsifs et des insecticides comme par exemple :

- l'acétylcholinestérase
- les récepteurs cholinergiques
- le canal sodium dépendant du potentiel

Les premiers résultats (voir figures 1 et 2 ci-dessous) indiquent que les neurones de moustiques en culture constituent un bon modèle pour étudier les effets des répulsifs et des insecticides. Ils expriment :

- des canaux sodium dépendants du potentiel fonctionnels, cibles des pyréthrinoides
- des récepteurs cholinergiques de type nicotinique, cibles des néonicotinoides

- des isoformes d'acétylcholinestérases, cibles des organophosphorés, des carbamates et de certains répulsifs comme le DEET

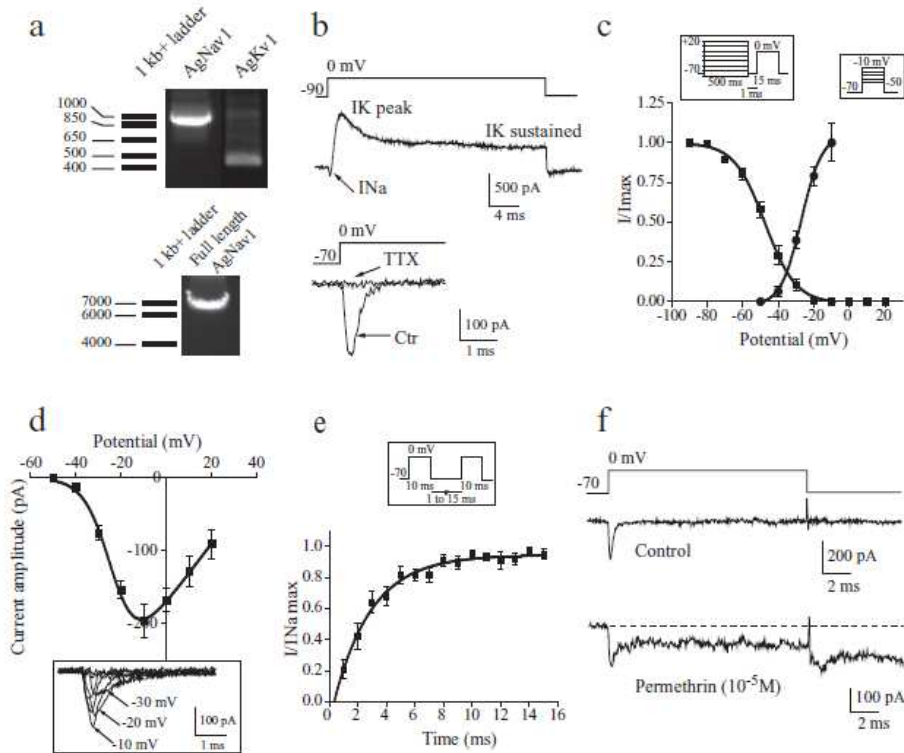


Figure 1: expression et propriétés électrophysiologiques du courant sodium de neurones de moustiques maintenus en culture. Comme indiqué en f, le courant sodium est sensible à la perméthrine (insecticide pyréthrianoïde de type I)

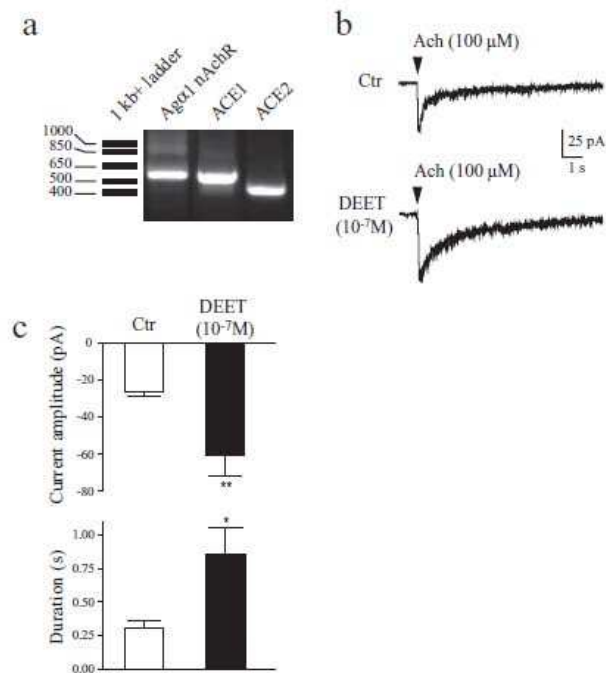


Figure 2: expressions des récepteurs cholinergiques de type nicotinique et de deux isoformes de l'acétylcholinestérase sensibles au répulsif le DEET.

Les résultats obtenus dans le cadre du programme REAC sont conformes aux objectifs fixés. Ils permettent de révéler des données fondamentales nouvelles pour la lutte anti-vectorielle en matière d'utilisation de répulsifs et d'insecticides appliqués seuls ou en association, avec des applications industrielles déjà engagées (voir 1^{er} point). De plus, la mise en évidence des cibles cellulaires et la caractérisation du mode d'action de certains répulsifs soulèvent des interrogations quant à la classification de ces produits (voir 2^{ème} point).

1^{er} point : Les moustiquaires imprégnées de PM+DEET et PM+KBR constituent un outil prometteur de lutte et de gestion de la résistance dans les populations d'anophèles vecteurs du paludisme. Néanmoins la forte volatilité des répulsifs nécessite de développer des formulations plus rémanentes (microcapsules, cyclodextrines, etc...) et/ou des technologies dites à « longue durée d'action » afin d'assurer une libération progressive de la matière active en surface des fibres. Ces activités de développement sont actuellement menées par certaines compagnies privées comme Sumitomo Chemical (Japon) ou Biosynthis (France)

2^{ème} point : Une étude multidisciplinaire intégrant des expériences de toxicologie (activité intrinsèque des insecticides/répulsifs), de biochimie (cinétiques enzymatiques, compétition enzyme/substrat/inhibiteur) et de neurophysiologie (activité synaptique et cellulaire, électropharmacologique et imagerie calcique) a été menée afin d'étudier les effets moléculaires et cellulaires induites par les répulsifs, seuls ou en association avec les insecticides.

Les résultats ont démontré pour la première fois la toxicité « potentielle » du DEET pour les insectes et les mammifères au niveau du Système Nerveux Central (SNC) (voir publication n°1). La technique électrophysiologique de l'oil-gap synaptique nous a permis de montrer que le DEET induit une perturbation bi-phasique de la transmission synaptique. Cet effet se traduisant par une augmentation rapide et transitoire de l'amplitude des Potentiels Post Synaptiques Excitateurs (PPSE) suivi d'une diminution. L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs muscariniques (atropine) bloquant la le feed-back négatif pré-synaptique, a montré que le DEET provoque une accumulation d'acétylcholine dans la fente synaptique. Ces résultats suggéraient que l'acétylcholine n'était plus hydrolysée en présence de DEET.

Les mesures de cinétique enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) ont montré que le DEET inhibe, par une action réversible, l'activité de l'AChE d'insecte et humaine mais aussi inhibe la carbamoylation de l'AChE par un carbamate, le propoxur. Le DEET entrerait en compétition direct avec le carbamate au niveau du site actif. Des expériences d'électrophysiologie complémentaires réalisées sur jonction neuromusculaire de souris ont révélé une augmentation d'environ trois fois de la constante de temps des potentiels synaptiques après perfusion du DEET par rapport au control. Ces résultats indiquent que le DEET persiste dans l'espace synaptique, activant les récepteurs cholinergiques nicotiques post synaptiques.

L'ensemble de ces résultats ont permis de modéliser, pour la première fois, l'interaction du DEET avec le site actif de l'AChE et de confirmer l'existence d'une compétition entre le DEET et certains carbamates. Ils pourraient, en partie, expliquer certaines pathologies observées chez les vétérans de la guerre du golf ayant utilisés le PB (carbamate) comme agent prophylactique des gaz organophosphorés et le DEET comme agent de protection contre les piqûres d'insectes.

Les résultats de cette étude parus dans la revue *BMC Biology* ont été repris dans de nombreux articles de presse (Nature magazine, Le monde, LCI, Ouest France, Sciences au Sud, etc...). La publication de notre article dans BMC Bology a été placée N°1 des articles les plus visités au sein des journaux BMC en 2009 (>10000 visites)

Liste des publications scientifiques

Publications scientifiques dans des journaux à comité de lecture du programme REAC

1. Corbel V, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D, Storjan J, Girard ME, Dimitrov M, Molgo J, Hougard JM & Lapied B 2009
Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biology*, 7: 47.
2. Pennetier C, Costantini C, Licciardi S, Dabiré RK, Corbel V, Lapied B, Chandre F & Hougard JM 2009
Synergy between repellents and Organophosphates on bed nets: Impact on efficacy and behaviour of natural free-flying resistant *An. gambiae* mosquitoes in Burkina Faso. *PLoS ONE*, 4(11).
3. Lapied B, Pennetier C, Apaire-Marchais V, Licznar P & Corbel V 2009
Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization. *Trends in Biotechnology*. 27(4):190-8.
4. Bonnet J., C Pennetier, S. Duchon, B. Lapied, V Corbel. 2009
Multi function oxidases are responsible for the synergistic interactions occurring between repellents and insecticides in mosquitoes. *Parasites & Vectors*, 16;2(1):17.
5. Pennetier, C., Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapied B, Chandre F & Hougard JM 2008
Mixture for controlling insecticide-resistant malaria vectors. *Emerging Infectious Disease*, 14, 1707-14.
6. Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, Lapied B & Hougard JM 2007
Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 29:6(1):38.

Publication en préparation

Lavialle-Defaix C, Legros C, Apaire-Marchais V, Pennetier C, Licznar P, Corbel V, Fournier D & Lapied B 2011
Anopheline mosquito neurons as biotechnology platform to study insecticide and repellent effects. *Nature Methods*

Article de vulgarisation

1. *Journaux spécialisés*: "Le répulsif DEET: cosmétique ou insecticide ? *Sciences au Sud*, N°52 Novembre/Décembre, 2009.

Communications scientifiques internationales

1. Corbel V, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D, Storjan J, Girard ME, Dimitrov M, Molgo J, Hougard JM & Lapied B 2009
Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet.
57th annual meeting of the Entomological Society of America, Indianapolis, USA 13-16 décembre, 00564 p79.

2. Defaix C., Legros Ch., Pennetier C., Corbel V., Hougard J.M. & Lapied B 2008
Fully differentiated isolated anopheline mosquito neurons : a new biological model to study the mode of action of repellents and insecticides
6th FENS meeting, 12-16 juillet, Genève, Suisse
3. Pennetier C, Costantini C, Chabi J, Dabiré RK, Corbel V, Lapied B, Pagès F & Hougard JM 2008
Combining organophosphates and repellents on fabrics: a promising strategy to better control pyrethroid resistant mosquitoes.
57th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, New Orleans, Louisiana, USA. 7-11 novembre, n°1217 p357 .
4. Lapied B, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D, Hougard JM & Corbel V 2008
Unexpected neurotoxic effects of the repellent DEET occur through an inhibition of acetylcholinesterase activity in the insect central nervous system
6th FENS meeting, 12-16 juillet, Genève, Suisse
5. Pennetier C, Licciardi S, Costantini C, Dabiré RK, Chandre F, Corbel V, Lapied B & Hougard JM 2007
A mixture of organophosphates and repellents is more effective than pyrethroids on mosquito nets in an area of insecticide resistance in Burkina Faso, West Africa.
5th European Congress of Tropical Medicine and International Health, 24-28 mai, Amsterdam, Pays-Bas.
6. Corbel V & Lapied B 2007
Insecticidal and Neurological effects of repellents on public health mosquitoes. *IVCC Innovative Vector Control Consortium. Insect Repellent_Workshop, 22-23 Janvier, London, United Kingdom.*
7. Hougard JM, Pennetier C, & Corbel V 2007
Interactions between insecticides and repellents when combined as mixtures. *IVCC Innovative Vector Control Consortium. Insect Repellent Workshop, 22-23 Janvier, London, United Kingdom.*

Communications scientifiques nationales

1. Licznar P, Lavalie-Defaix C, Apaire-Marchais V, Pennetier C, Legros C, Corbel V & Lapied B 2010
Mosquito borne-disease vector isolated neurons: a new biological model for optimizing insecticide/repellent efficacy while reducing adverse effects on ecosystem
EDEN International Conference, 10-12 mai, Montpellier
2. Lavalie-Defaix C., Legros C., Apaire-Marchais V., Licznar P. & Lapied B 2009
Présentation d'un nouveau modèle biologique dans la stratégie de lutte antivectorielle.
Journée Scientifique du SCIAM, 22 janvier, Angers

Conférence sur invitation

1. Lapied B. (2009)
Le neurone de moustique : un nouveau modèle clé dans la stratégie de lutte antivectorielle
Journée scientifique du SCIAM, Université d'Angers, 22 janvier, Angers

2. Lapied B. (2009)

Les répulsifs anti-moustiques, mode d'action et cible

Journées de Recherche ESTUAE 2009, *l'Institut de l'Homme et de la Technologie – Ecole Polytechnique de l'Université de Nantes*, 5 novembre, Nantes

Perspectives ouvertes par le programme

Comme indiqué ci-dessus, les principaux résultats obtenus permettent d'envisager des perspectives excitantes pour une optimisation de l'utilisation des répulsifs et/ou des insecticides utilisés seuls ou en association avec des insecticides en augmentant leurs efficacités tout en réduisant les doses utilisés. L'utilisation de virus insecte comme agent synergisant associé à une substance active (répulsif ou insecticide) constitue une stratégie innovante dans la lutte anti-vectorielle.