

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

Ecole doctorale Sciences Chimiques et Biologiques de la Santé (CBS²)

Discipline : Biologie des Populations et Ecologie

Formation doctorale : Parasitologie

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER I

Par

Cédric PENNETIER

**Interactions entre insecticides non-pyréthrinoïdes et répulsifs pour
la lutte contre *Anopheles gambiae* :
Mécanismes, efficacité et impact sur la sélection de la résistance**

Soutenue publiquement le 22 Janvier 2008 devant le jury composé de,

M. Stephen Torr, Reader, NRI, Greenwich University, Chatam

Rapporteur

M. Gérard Duvallet, Professeur, Université de Montpellier III

Rapporteur

M. Jean-Pierre Dedet, Professeur, Université Montpellier I

Examinateur

M. Vincent Corbel, Chargé de Recherche, IRD, Montpellier

Examinateur

M. Jean-Marc Hougard, Directeur de recherche, IRD, Cotonou, Bénin

Directeur de thèse

M. Bruno Lapied, Professeur, Université d'Angers

Co-directeur de thèse

Remerciements

Mes premières pensées durant la rédaction de ce manuscrit et avec un peu de recul vont vers Jean-Marc Hougard et Vincent Corbel, sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Jean-Marc, depuis le DEA où tu m'as offert de travailler sur un sujet original et très intéressant, tu m'as accompagné et soutenu. Merci. Merci aussi pour m'avoir fait partager ton expérience et ta culture scientifique et pour ta confiance qui est source intarissable de motivation. Travailler sous ta direction a été un plaisir et un honneur. Difficile de te remercier en quelques phrases tant je te suis redevable. Simplement, j'ai pu réaliser ce travail en toute sérénité dans des conditions idéales grâce à toi, alors merci.

Vincent, j'ai franchi la porte du laboratoire au moment où tu rédigeais ta thèse. Depuis tu as été présent à chaque étape de ce travail. Tu t'es beaucoup investi dans l'encadrement ma thèse (jusque dans des moments plus informels), en cela je te suis extrêmement reconnaissant. Tu as été et reste un exemple pour moi. Ca a été un plaisir de travailler avec toi. Pourvu que ça dure, Inch'Allah !

J'ai eu la chance de travailler en co-direction avec Bruno Lapiet.

Bruno, je te remercie de m'avoir fait découvrir et initié à cette belle discipline qu'est l'électrophysiologie. Tu m'as fait partager ton immense expérience des neurosciences, ce qui me donne envie de pousser un peu plus loin dans ce domaine. Enfin ton enthousiasme a été un moteur durant ces mois partagés au laboratoire RCIM.

Aux membres du jury,

Dr Stephen Torr, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer mon travail. C'est un honneur pour moi. Mes remerciements s'adressent aux professeurs Gérard Duvallet et Jean-Pierre Dedet, éminents spécialistes en parasitologie qu'ils enseignent à toute une génération d'étudiants dont je fais partie. Je suis très honoré de vous compter parmi les membres de mon jury.

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité de recherche O16 de l'IRD, « caractérisation et contrôle des populations de vecteurs », dirigée par Didier Fontenille, que je remercie pour sa confiance et son accueil. L'UR016 est constituée d'une implantation principale, le LIN de Montpellier et d'implantations secondaires avec parmi elle, le Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou

et l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé de Bobo-Dioulasso. Dans ces 3 implantations il m'a été donné de rencontrer et de travailler avec des personnes que je tiens à remercier aujourd'hui.

Au LIN, il règne une excellente ambiance qui rend chaque jour de travail agréable. Je remercie les piliers de l'équipe « insecticide » Luc, Stéphane, Julien, Frédéric et Frédéric (c'est pas une répétition) et ainsi que nos sauveuses au quotidien Marie-Claude et Valérie dit « Valou » sans qui la vie nous serait insupportable. Je ne boude pas l'équipe « caractérisation » : Anna, Cécile, Zeinab, Peter, Diego, Nicolas, bien au contraire, nous aimerais nous rapprocher de vous (pour une interaction synergique) !! J'ai rencontré à mon retour en France la nouvelle génération avec qui j'apprécie vraiment travailler, Betty, Céline, Marie-Noëlle, Caroline, Sébastien, Nil. Merci à tous.

Au RCIM, j'ai une pensée particulière pour Hélène Gautier pour ton aide indispensable, je crois pouvoir dire sans me tromper que l'on peut compter sur toi. Merci pour tout ! Merci à Zeineb, Céline, Olivier, Hélène (avec une mention spéciale pour m'avoir supporté chez toi), Christian et Alain.

Avant de m'adresser aux personnes qui ont fait de mon expérience au Bénin et au Burkina Faso une expérience extraordinaire, je tiens à remercier les représentants de l'IRD et des différentes institutions qui l'ont rendu possible en m'accueillant. Merci à Moumouni Traoré Lamizana (Bénin), Bruno Bordage (Bénin), Jean-Pierre Guengant (Burkina Faso), Philippe Mselatti et maintenant Vincent Jamonneau (Bobo-Dioulasso). Merci à Martin Akogbeto qui dirige le CREC à Cotonou et à Jean-Bosco Ouedraogo qui dirige l'IRSS de Bobo-Dioulasso. Je tiens aussi à remercier les personnels du Ministère des Affaires Etrangères, je pense en particulier à Xavier Garde et René Boissenin.

Pour l'aide qu'ils m'ont apportée, je veux remercier :

A Cotonou, Fabrice Chandre, Thibaud Martin, Joseph Chabi, Séverine Licciardi, Félix Zouménou, Cyrille Agoli-Agbo, Luc Djogbenou, Ibrahim Siddick, Armel Djenontin, Pélagie Boko, Abibatou Odjo, Marie-Claire Henry, Alain Naoum et Sébastien Koundenoukpo. Je tiens à remercier nos collègues et amis de la London School of Tropical Medicine & Hygiene, Raphaël N'Guessan et Seth Irish. Merci également à André Garcia, Agnès Leport, Agnès Aubouy, Nadine Fievet, Florence Migot-Nabias, Josette Berduck, Gaëtan Sessinou, Chancel Konate, Bellinda Ahonon.

A Bobo-dioulasso, Roch Dabiré, Clément Gouagna, Abdoulaye Ouattara, Philippe Solano, Vincent Jamonneau, Souleymane Sanon, Philippe Mselatti, Israël Yameogo, Mme Diallo, Seïbou Nignan, Marco Pombi, Thierry Lefèvre, Amidou Ilboudo. J'ai une attention particulière pour Carlo Costantini qui m'a initié aux joies de GLIM, m'enseignant ainsi la puissance et le rôle des statistiques et de la modélisation dans nos disciplines. Merci aussi Carlo pour ton aide précieuse dans la rédaction des articles et pour m'avoir fait partager un peu de ta large culture scientifique au cours de discussions passionnantes.

Je tiens à remercier l'équipe de « captureurs » de VK7 à Bama pour le travail remarquable qu'ils ont réalisé et pour leur accueil chaleureux au sein de leur village.

Je remercie le Professeur Maria Stankiewicz de l'Université Copernic, Torun, Pologne ainsi que Didier Fournier et son équipe pour cette fructueuse collaboration sur l'étude du mode d'action du DEET. Merci Didier pour tes conseils toujours extrêmement pertinents (et pour Gosa).

Je tiens aussi à remercier des personnes qui m'ont guidé ou soutenu plus tôt dans mon parcours universitaire. Je pense particulièrement au Professeur Michel Marjolet de l'Université de Nantes (qui m'a aiguillé vers l'entomologie médicale) et à Catherine Moullia maître de conférence à l'Université Montpellier II (qui m'a soutenu durant la maîtrise BPE).

Ce travail de thèse a bénéficié du soutien financier de l'Institut de Recherche pour le Développement, du Ministère des Affaires Etrangères, de la Fondation de France (Fonds Inkermann, Monsieur François Lacoste) et de l'entreprise Osler (en la personne d'Eric Lundwall).

Il est temps de remercier les amis sur qui j'ai pu compter et avec qui j'ai partagé des bons moments durant cette thèse. Tout d'abord merci au vainqueur Dr Koffi Gombo Courtin pour m'avoir appris la valeur du wari. Merci aux familles Chandre, Martin, Garcia, Jamonneau, Solano. Un merci particulier à Raphaël N'Guessan pour mon « akwaba » sur le continent et son hospitalité durant les premières semaines. Merci à mon ami et colocataire Seth Irish, à Séverine, Gaëtan, Césaire, Paolo et Agnès, Paulux, Benji, Pierre et Fatiha, Christine, Mathurin Koffi. Merci à mes colocataires d'Angers, Clémentine et Jacques avec qui j'ai passé des mois... excellents. Merci à Nico, Christophe, FM, Pierre-Emmanuel et Jojo, on ne s'est pas beaucoup vu mais vous êtes toujours là. Mes pensées se tournent également vers Eugène et Chantal pour leur joie de vivre au quotidien. Merci Florence d'avoir été là pour moi.

Enfin un grand merci à ma famille, ma petite sœur Mathilde et mon grand petit frère Juju la Praline, ma future « belle-sœur » Amélie pour m'avoir soutenu et avoir supporté tous les corollaires de ce travail et de mon caractère. Je terminerai en remerciant mes parents qui m'ont apporté un soutien sans faille depuis le début. Merci de dépasser vos limites pour nous.

Pour finir, merci de me pardonner à ceux que j'ai omis de citer.

« Initchié », « awanou kaka », merci

RESUME

Interactions entre insecticides non-pyréthrinoïdes et répulsifs pour la lutte contre *Anopheles gambiae* : mécanismes, efficacité et impact sur l'évolution de la résistance

Les moustiques anophèles sont les vecteurs du parasite *Plasmodium falciparum*, principal agent du paludisme humain en Afrique sub-saharienne. L'utilisation massive de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes est la stratégie anti-vectorielle recommandée par l'OMS pour limiter la transmission du paludisme. La résistance aux pyréthrinoïdes se développe parmi les vecteurs majeurs du paludisme, notamment par l'intermédiaire de la mutation *Kdr* qui confère une résistance croisée à tous les pyréthrinoïdes, et risque de compromettre l'efficacité des moustiquaires imprégnées. La recherche d'alternatives aux pyréthrinoïdes est donc une priorité. Dans ce travail, nous avons initié l'étude d'un nouveau concept : combiner un insecticide non-pyréthrinoïde et un répulsif sur une moustiquaire afin de maintenir son efficacité contre des moustiques résistants aux pyréthrinoïdes.

Les études menées au laboratoire ont permis de mettre en évidence des interactions de type synergique entre des insecticides carbamates ou organophosphorés (OPs) et des répulsifs sur des moustiques vecteurs. Ces interactions positives ont conféré aux mélanges des caractéristiques comparables à celle d'un pyréthrinoïde standard en termes d'effet insecticide, d'effet knock down et d'irritabilité et ont augmenté le temps d'efficacité des molécules sur la moustiquaire. Ces caractéristiques se sont maintenues contre des moustiques résistants aux pyréthrinoïdes (gène *Kdr*).

Deux mélanges ont été évalués contre des populations naturelles d'*An. gambiae*. Pour la première fois, une synergie observée en laboratoire a été retrouvée sur le terrain. Les moustiquaires imprégnées de ces mélanges ont conféré une protection et une efficacité comparable à un pyréthrinoïde standard sur une population d'*An. gambiae* sensible aux insecticides. Leur efficacité s'est maintenue contre des *An. gambiae* fortement résistants aux pyréthrinoïdes (gène *Kdr*) et aux OPs et carbamates (gène *Ace.1^R*). De plus l'utilisation de ces mélanges sur moustiquaire n'a induit aucune pression de sélection sur ces gènes de résistance (*Kdr* et *Ace.1^R*).

Les mécanismes physiologiques à l'origine de la synergie ont été étudiés afin d'optimiser l'utilisation des mélanges en santé publique. Dans la mesure où le mode d'action des répulsifs était mal connu, nous avons, par des approches toxicologique, électrophysiologique et biochimique, identifié l'acétylcholinestérase comme cible du dyéthyl-m-toluamide (DEET) dans le système nerveux central (SNC) des insectes. Nos résultats actuels sur le mode d'action du DEET ont permis de proposer une cascade d'événements menant à une augmentation importante de la concentration en calcium intracellulaire laquelle entraîne la mort des neurones de l'insecte. Ces deux effets au niveau du SNC de l'insecte peuvent expliquer la neurotoxicité du DEET et la synergie détectée avec les OPs ou les carbamates.

Ces études sur les interactions insecticide non-pyréthrinoïde / répulsif offrent des perspectives opérationnelles alternatives aux pyréthrinoïdes. D'une manière générale, ce travail souligne l'intérêt d'utiliser les répulsifs pour la lutte anti-vectorielle et la nécessité de mieux comprendre leurs modes d'action au niveau du système nerveux des insectes vecteurs. En effet, l'élargissement de la gamme de molécules disponibles pour la lutte anti-vectorielle peut permettre la mise en place de nouvelles stratégies et contribuer à une meilleure gestion de la résistance chez les insectes vecteurs de maladies humaines.

Mots clés : *Anopheles gambiae*, paludisme, insecticides, répulsifs, résistance, moustiquaires, mode d'action

ABSTRACT

Interactions between non-pyrethroid insecticides and insect repellents on *Anopheles gambiae*: Mechanisms, efficacy and impact on resistance gene evolution

Anopheles mosquitoes are vectors of *Plasmodium falciparum*, the main human malaria parasite in sub-Saharan Africa. Large scale use of Insecticides Treated bed Nets (ITNs) is the strategy recommended by the WHO to limit malaria transmission. Pyrethroid resistance is widespread across malaria vector populations, particularly the *Kdr* mutation which confers cross-resistance to all pyrethroids and may threaten the efficacy of ITNs. Research to find alternatives to pyrethroids has become a priority. In this thesis, we investigated a new concept : combining a non-pyrethroid insecticide and an insect repellent on bed nets in order to maintain the efficacy of ITNs against pyrethroid-resistant mosquitoes.

Studies carried out in the laboratory showed synergistic interactions between carbamate or organophosphate insecticides and insect repellents against mosquitoes. Mixtures had similar effects to pyrethroids in terms of the insecticidal and knock down effects, irritancy and residual effect. These characteristics were still present against pyrethroid-resistant mosquitoes.

Two mixtures were evaluated against wild populations of *An. gambiae*. For the first time, synergistic interactions discovered in the laboratory were observed in the field. Insecticide Repellent Treated bed Nets (IRTNs) were as efficient as a standard ITN impregnated with deltamethrin against susceptible wild malaria vectors. Their efficacy was maintained against multilocus resistant mosquitoes sharing *Kdr* and *Ace.1^R* resistance genes. Moreover using IRTNs did not induce selection pressure for *Kdr* and *Ace.1^R* resistance genes.

We searched for physiological phenomena that induced synergy to optimize insecticide-repellent mixtures use in public health programs. The mode of action of repellents is unknown, so we used toxicological, physiological and biochemical approaches to identify one target of DEET in the insect central nervous system: acetylcholinesterase. We also showed that DEET killed insect neurons through an elevation of the intracellular calcium concentration. These two phenomena should explain the neurotoxicity of DEET and may be involved in the synergistic interactions with OPs and carbamates.

These studies on non-pyrethroid insecticides and insect repellents suggested promising operational perspectives to replace pyrethroids. Altogether this thesis underlines the benefits of using insect repellents in vector control programs and the need to better understand their mode of action on insect nervous system. Indeed, widening the number of molecules available for vector control may be helpful to create new strategies and should contribute to a better resistance management of human disease vectors.

Key words: *Anopheles gambiae*, malaria, insecticides, repellents, resistance, bed nets, mode of action

TABLE DES MATIERES

1 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	9
1.1 Les <i>Anopheles</i> vecteurs	9
1.1.1 Distribution et bioécologie d' <i>An. gambiae</i> s.s. et <i>An. arabiensis</i>	9
1.1.2 Rôle vectoriel.....	10
1.2 Les stratégies de lutte contre les <i>An. gambiae</i>	10
1.2.1 Lutte anti-larvaire.....	11
1.2.2 Lutte adulticide	11
1.2.3 Réduction du contact homme-vecteur.....	11
1.3 Les insecticides.....	12
1.4 La résistance aux insecticides	14
1.4.1 Résistance métabolique.....	15
1.4.2 Modification de cible.....	15
Le canal sodium.....	16
L'acétylcholinestérase	16
1.4.3 Impact de la résistance sur les programmes de luttes contre <i>An. gambiae</i>	17
1.4.4 Gestion de la résistance	17
1.5 Les répulsifs.....	19
1.5.1 Mode d'action des répulsifs.....	20
1.5.2 Efficacités comparées.....	21
1.5.3 Répulsifs et moustiquaires imprégnées	21
1.6 Présentation du travail de thèse	22
2 ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES INSECTICIDES CARBAMATES OU ORGANOPHOSPHORÉS ET LES RÉPULSIFS	23
2.1 Interactions entre le DEET et le propoxur sur le modèle biologique <i>Ae. aegypti</i> : mortalité, effet knock-down et irritabilité	23
2.2 Interactions entre le pyrimiphos-méthyl et les répulsifs, DEET et KBR sur tissu moustiquaire contre <i>An. gambiae</i>	24
3 ETUDE DE L'EFFICACITÉ DE MOUSTIQUAIRES IMPRÉGNÉES DE MÉLANGES OPS/RÉPULSIFS CONTRE AN. GAMBIAE SENSIBLES ET RÉSISTANTS AUX INSECTICIDES (BOBO DIOULASSO, BURKINA FASO).....	27
3.1 Interactions entre le DEET ou le KBR et le pyrimiphos méthyl : synergie insecticide et modifications du comportement d' <i>An. gambiae</i>	28

3.2	Efficacité comparée des mélanges PM/DEET et PM/KBR, avec une formulation standard de deltaméthrine contre <i>An. gambiae</i> résistants aux insecticides.....	29
4	RECHERCHE DE FORMULATIONS RÉMANENTES DE RÉPULSIFS.....	31
4.1	Evaluation d'une nouvelle formulation DEET sur tissu moustiquaire contre <i>An. gambiae</i>	31
5	DIETHYL-M-TOLUAMIDE OU DEET : ETUDE DE SON MODE D'ACTION SUR LE SYSTÈME NERVEUX DE L'INSECTE	33
5.1	Etude de l'effet du DEET sur la transmission synaptique chez l'insecte.....	34
5.2	Etude l'effet du DEET sur le corps cellulaire d'un neurone pacemaker de <i>Periplaneta americana</i>	34
6	DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	38
6.1	Une nouvelle méthode de lutte contre les vecteurs	38
6.1.1	<i>Synergie OPs ou carbamates / répulsifs.....</i>	38
6.1.2	<i>Potentialités de ce nouvel outil.....</i>	39
6.1.3	<i>Gestion de la résistance</i>	39
6.1.4	<i>Autres applications possibles.....</i>	40
6.1.5	<i>Limites actuelles</i>	40
6.2	Les répulsifs en santé publique	41
6.2.1	<i>Le mode d'action des répulsifs.....</i>	41
6.2.2	<i>Mécanismes physiologiques à l'origine des interactions synergiques</i>	42
6.2.3	<i>Répulsifs et modifications du comportement de recherche de l'hôte.....</i>	43
6.3	Conclusion générale	44
7	BIBLIOGRAPHIE	45

Liste des annexes

Article 1 : Pennetier C, Corbel V and Hougard JM. 2005. *Combining a non-pyrethroid insecticide and a repellent : a new approach for controlling Kdr resistant mosquitoes.* Am J Trop Med Hyg 72 (6), 739-744.

Article 2 : Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, Lapiède B, Hougard JM. 2007. *Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against Anopheles gambiae.* Malaria J, Mar 29;6(1) :38.

Article 3 : Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapiède B, Chandre F, Hougard JM. 2007. *Synergy between repellents and Organophosphates on bed nets: Impact on nets' efficacy and behaviour of natural free-flying resistant An. gambiae mosquitoes in Burkina Faso.* En préparation.

Article 4 : Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapiède B, Chandre F, Hougard JM. 2007. *A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors : low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multilocus resistant Anopheles gambiae.* Soumis à Emerg Inf Dis.

Article 5 : N'Guessan R, Knols BJ, Pennetier C, Rowland MW. 2007. *Deet microencapsulation : a slow release formulation enhancing the residual efficacy of bednets against malaria vectors.* Trans Roy Soc trop Med Hyg. Sous presse.

Article 6 : Corbel V, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D, Dimitrov M, Gautier H, Stojan J, Hougard J-M, Lapiède B. 2007. *The dark side of DEET: evidence of inhibition of acetylcholinesterase activity in both insect and human central nervous system.* En préparation.

Article 7 : Pennetier C, Gautier H, Corbel V, Hougard J-M, Lapiède B. 2007. *The insect repellent DEET exerts neurotoxic effects through an elevation of intracellular calcium concentration in pacemaker insect neurosecretory cells.* En préparation (en français)

Article 8 : Lundwall E, Pennetier C, Corbel V, DeGentile L et F Legros. 2005. *Paludisme : Où en est la prophylaxie d'exposition ?* Rev Prat 55 (8), 841-848.

Annexe 9 : Instructions et protocoles pour les bio-essais et les évaluations en cases expérimentales.

Ce travail de thèse est une contribution à la recherche d'une stratégie de lutte contre les vecteurs du paludisme utilisant des insecticides autres que les pyréthrinoïdes. Cette stratégie consiste à associer sur une même moustiquaire un produit répulsif et un insecticide non-pyréthrinoïde. Avant de présenter la problématique scientifique et les objectifs de ce travail, une brève revue sera faite des moyens de lutte anti-vectorielle utilisés contre les moustiques vecteurs, des molécules insecticides et répulsives disponibles ainsi que les problèmes liés au développement de la résistance aux insecticides.

Avant-propos

Une maladie à transmission vectorielle est une maladie dont l'agent pathogène est transmis d'un malade à l'autre par un animal. Une grande partie des maladies infectieuses humaines est transmise par des insectes comme l'onchocercose (transmise par les simulies, *Simulium* sp.), la trypanosomiase humaine africaine (transmise par les mouches tsé-tsé, *Glossina* sp.), la trypanosomose américaine (transmise par des triatomines, *Triatoma* sp.), la leishmaniose ou la maladie de Lyme (transmise par des tiques). Un large groupe de maladies infectieuses est transmis par des moustiques (Diptera : Culicidae) avec parmi elles, la fièvre jaune (*Aedes* sp.), la dengue hémorragique (*Aedes* sp), le chikungunya (*Aedes* sp.), la maladie du West Nile (*Culex* sp), l'encéphalite japonaise (*Culex* sp.), le virus de la Vallée du Rift ainsi que certaines filarioSES (*Anopheles* & *Culex* sp) et le paludisme (*Anopheles* sp) (Kettle 1995; Gratz 1999; Mullen & Durden 2002). Ce dernier constitue la plus importante maladie infectieuse à transmission vectorielle dans le monde (Collins & Paskewitz 1995).

Plus de deux milliards de personnes (environ 40% de la population mondiale) vivent dans des zones à risques de paludisme, notamment en Asie, en Amérique latine et en Afrique (Collins & Paskewitz 1995; Hay *et al* 2004). Plus de 500 millions de cas cliniques sont recensés chaque année, causant une forte morbidité et mortalité (Gratz 1999). L'incidence du paludisme est estimée à plus d'un million de morts par an, dont 90% en Afrique sub-saharienne (Breman 2001; Breman *et al* 2001; Mouchet *et al* 2004). On attribue au paludisme un rôle majeur dans le faible développement économique en Afrique, continent où la transmission est la plus intense (Snow *et al* 2005). De plus le paludisme réapparaît et se développe dans des régions où il avait été autrefois éliminé. Cette expansion est liée notamment aux facteurs écologiques et sociaux changeant tels que la déforestation, le réchauffement global, les migrations de populations, l'urbanisation et l'industrialisation (Omumbo *et al* 2004; Reiter *et al* 2004; Hay *et al* 2005a; Hay *et al* 2005b; Omumbo *et al* 2005).

Le paludisme est causé par des protozoaires parasites du genre *Plasmodium*. Des quatre espèces parasites de l'homme, trois appartiennent au sous-genre *Plasmodium*, *Plasmodium vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* alors que la quatrième, *P. falciparum* qui appartient au sous-genre *Laverania*. *P. malariae* et *P. ovale* ne semblent pas provoquer d'accès grave. Les cas à *P. vivax* sont plus sévères mais en général non mortels, alors que *P. falciparum* est toujours dangereux pour les individus non immunisés (Collins & Paskewitz 1995). *P. falciparum* est l'espèce la plus répandue en Afrique sub-saharienne. Les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes sont les plus vulnérables aux crises à *P. falciparum* (WHO 2000). Plus de détails ou de références concernant les quatre espèces de *Plasmodium* parasites de l'homme, dont les aspects cliniques et

épidémiologiques du paludisme sont notamment disponibles dans le livre intitulé « Biodiversité du paludisme dans le monde » (Mouchet *et al* 2004) et le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO 2005a).

Tous les vecteurs du paludisme chez l'homme appartiennent au genre *Anopheles* (Diptera : Culicidae). Parmi les 422 espèces d'*Anopheles* recensées, seulement 68 sont reconnues comme vecteurs du paludisme, dont 40 sont considérées comme importantes (Service 1993). Pour être un vecteur potentiel des *Plasmodium* humains, un anophèle doit (i) être génétiquement compatible au développement du parasite, (ii) avoir un comportement anthropophile, c'est à dire préférer prendre ses repas sanguin sur l'homme et enfin (iii) avoir une durée de vie adulte suffisante pour permettre la réalisation du cycle sporogonique. Ce dernier point est à la base des stratégies de lutte anti-vectorielle visant à diminuer la longévité des vecteurs d'âge épidémiologiquement dangereux.

La lutte contre la transmission du paludisme repose à la fois sur la diminution du nombre de porteurs de gamétocytes par des mesures préventives et curatives chimiques, et sur la diminution des populations de vecteurs, principalement par l'utilisation d'insecticides. Néanmoins, il n'existe pas encore de vaccin efficace disponible contre le paludisme et les résistances aux médicaments les moins chers et les plus utilisés sont largement répandues (Greenwood *et al* 2005; WHO 2005b). La lutte anti-vectorielle apparaît aujourd'hui comme étant l'une des principales méthodes de prévention de masse applicable contre le paludisme. Les méthodes de lutte contre les vecteurs sont nombreuses et font appel à la destruction physique des gîtes, la lutte biologique et chimique ainsi que la lutte génétique. Le choix de la stratégie doit donc s'appuyer sur toutes les connaissances disponibles sur les populations de vecteurs. A l'heure actuelle, les moustiquaires imprégnées d'insecticides constituent l'outil majeur de lutte contre la transmission du paludisme (Greenwood *et al* 2005) car la biologie et l'écologie des espèces d'anophèles vectrices ne favorisent pas la lutte larvaire, dans la plupart des pays d'Afrique sub-saharienne. Il faut noter que les aspersions intra domiciliaires d'insecticides rémanents ne réduisent efficacement la transmission que dans des zones de paludisme instable ou lorsque surviennent des épidémies (Kolaczinski *et al* 2007).

Les pyréthrinoïdes sont les seuls insecticides recommandés pour l'imprégnation des moustiquaires (Zaim *et al* 2000). En effet, ils présentent des propriétés physico-chimiques nécessaires pour protéger à la fois l'utilisateur de la moustiquaire et avoir un impact au niveau communautaire (Henry *et al* 2005; Fegan *et al* 2007). Les pyréthrinoïdes sont inoffensifs pour l'homme, agissent très rapidement sur les moustiques (effet knock down) et présentent un effet excito-répulsif (Zaim *et al* 2000). Cet effet excito-répulsif empêche le moustique de rester suffisamment longtemps au même endroit sur la moustiquaire pour pouvoir piquer en cas de contact entre le dormeur et la moustiquaire pendant son sommeil.

Malheureusement, les résistances aux pyréthrinoïdes sont largement répandues dans les pays d'Afrique où le paludisme est endémique, comme en Côte d'Ivoire (Chandre *et al* 1999), en Afrique du Sud (Hargreaves *et al* 2000), au Burkina Faso (Diabate *et al* 2004), au Ghana (Yawson *et al* 2004), en Guinée Equatoriale (Reimer *et al* 2005), en Angola (Cuamba *et al* 2006), au Gabon (Pinto *et al* 2006) ou au Bénin (Corbel *et al* 2007). La recherche d'alternative aux pyréthrinoïdes est à présent une priorité (Zaim & Guillet 2002; Hemingway *et al* 2006). De nouvelles familles insecticides utilisées en agriculture (METI, phénylpyrazoles, néonicotinoïdes) pourraient offrir d'intéressantes perspectives pour la lutte anti-vectorielle.

Toutefois ces molécules n'ont pas encore franchi tous les tests d'homologation, de plus les contraintes spécifiques liées à leur utilisation en santé publique font qu'elles ne pourront pas être disponibles avant plusieurs années. Une autre stratégie est l'utilisation optimale des molécules insecticides disponibles et autorisées en santé publique comme les carbamates ou organophosphorés (c.f. § 1.2.3) bien qu'ils ne présentent pas l'effet excito-répulsif nécessaire pour protéger l'utilisateur de moustiquaire (Miller *et al* 1991).

Dans l'objectif de maintenir à la fois cet effet excito-répulsif combiné à l'efficacité insecticide des moustiquaires imprégnées, et de gérer le problème de la résistance croissante aux pyréthrinoïdes, l'utilisation simultanée d'insecticides à modes d'action différents est envisagée. Des études sur les interactions entre insecticides ont été menées sur des moustiques d'*An. gambiae* sensibles et résistants aux pyréthrinoïdes. Celles-ci ont révélé des effets de synergie entre des pyréthrinoïdes et des carbamates / organophosphorés sur des moustiques sensibles d'*An. gambiae* (Corbel *et al* 2002; Darriet *et al* 2003; Corbel *et al* 2004a; Corbel *et al* 2006). Ces interactions ont permis d'augmenter, par rapport aux « mono-traitements », l'efficacité des moustiquaires imprégnées tant sur l'effet Knock Down (KD) que sur la mortalité. En revanche, aucune synergie n'a été mise en évidence sur des moustiques résistants aux pyréthrinoïdes par la présence de la mutation *Knock down resistance (Kdr)* (Darriet *et al* 2003; Darriet *et al* 2005). De plus, les individus résistants, moins sensibles à l'effet irritant, peuvent rester plus longtemps sur la moustiquaire, piquer l'hôte et potentiellement transmettre le parasite (Corbel *et al* 2004b).

C'est dans ce contexte que nous avons envisagé de mélanger un insecticide non-pyréthrinoïde et un répulsif sur les moustiquaires dans l'objectif de reconstituer les propriétés intrinsèques des pyréthrinoïdes et ainsi d'améliorer la lutte contre les anophèles résistants. Dans ce chapitre introductif, nous rappellerons brièvement les particularités biologiques et écologiques des espèces vectrices majeures du paludisme en Afrique sub-saharienne. Ensuite, nous ferons un état des lieux des méthodes utilisées contre les principaux anophèles vecteurs et des molécules insecticides et insectifuges disponibles en santé publique. Nous discuterons enfin des différents types de résistance aux insecticides susceptibles de compromettre les programmes de lutte. Ce chapitre introductif sera suivi d'une présentation des axes de recherche développés dans ce travail de thèse.

1 INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Les *Anopheles* vecteurs

Les 4 espèces du genre *Plasmodium* responsables des paludismes humains sont transmises exclusivement par des moustiques du genre *Anopheles*. Ce genre comprend environ 400 espèces dont une soixantaine vectrices (Figure 1). A elles seules, *An. gambiae* et *An. arabiensis* sont globalement responsables de 90% de la transmission du paludisme dans la zone intertropicale africaine (Robert & Carnevale 1984).

1.1.1 Distribution et bioécologie d'*An. gambiae* s.s. et *An. arabiensis*

Les deux espèces *An. gambiae* et *An. arabiensis* présentent des limites de distribution en Afrique qui semblent être déterminées par les conditions climatiques (Mouchet *et al* 2004). *An. gambiae* s.s. est l'une des espèces les plus répandues du complexe *An. gambiae* (qui en comprend 7), elle occupe les zones de forêt mais remonte loin dans les savanes humides jusqu'à la limite de la ceinture sahélienne pré-désertique. *An. arabiensis* est présent au Sahel et sur les plateaux d'Afrique méridionale. Il s'enfonce assez profondément dans les savanes humides, englobant la zone de répartition d'*An. gambiae* s.s. (Mouchet *et al* 2004). La zone de recouvrement en ces deux espèces est d'ailleurs assez large.

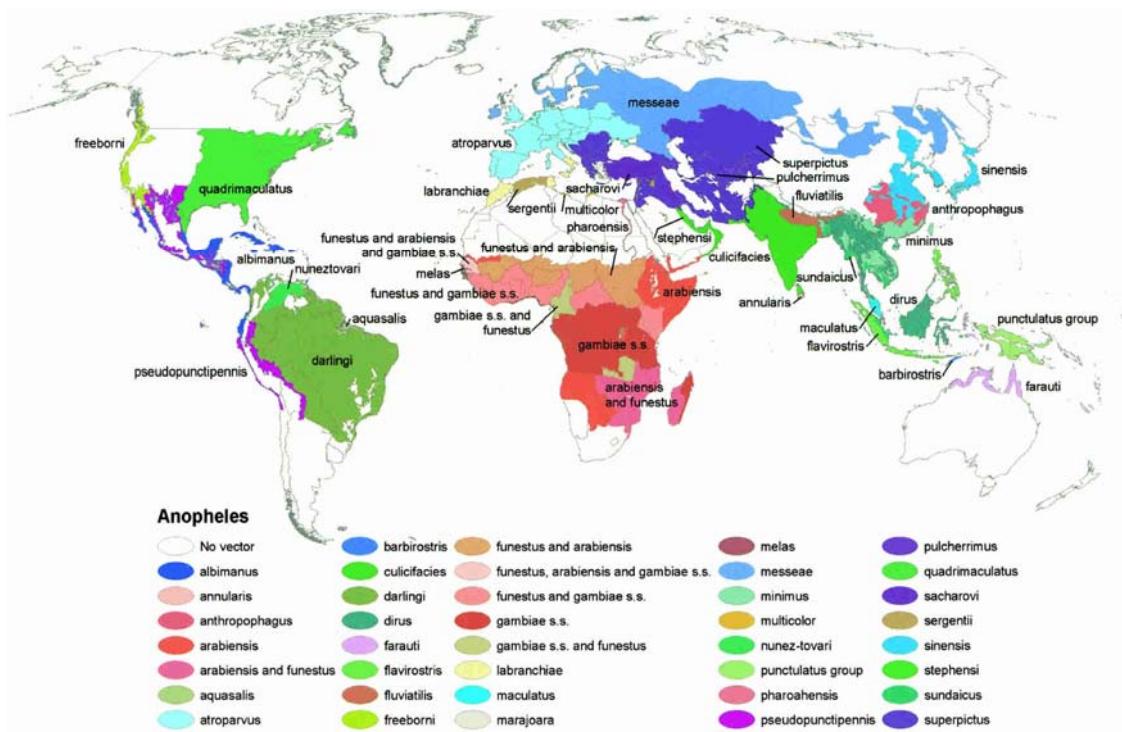


Figure 1 : Distribution globale des anophèles vecteurs principaux, secondaires et potentiels (Kiszewski *et al* 2004).

Les femelles d'*An. gambiae* s.s. sont hautement anthropophiles, s'alimentant préférentiellement sur des humains (Coluzzi *et al* 1979). Toutefois, en Afrique de l'Ouest, elles peuvent être moins sélectives et se nourrir facilement sur d'autres animaux comme les chevaux et le bétail (Diatta *et al* 1998). A la différence d'*An. gambiae*, *An. arabiensis* a un comportement beaucoup plus flexible avec une anthropophilie et une endophilie partielles en présence d'hôtes alternatifs (Gillies & Coetzee 1987; Costantini *et al* 1998). Il est capable de se développer dans des zones totalement sauvages, adoptant alors un comportement exclusivement zoophile (Duchemin *et al* 2001). En général *An. gambiae* s.s., à cause de son anthropophilie préférentielle, a développé une tendance forte pour l'endophagie et endophilie, tandis que le plus zoophile *An. arabiensis* a une tendance plus exophage et exophile.

An. gambiae s.s. a été reconnu comme composé de plusieurs formes chromosomiques. Cinq formes ont été identifiées en Afrique de l'Ouest : les formes Forêt, Savane, Bissau, Mopti et Bamako (Toure *et al* 1983; Coluzzi *et al* 1985). La prévalence de ces formes répond essentiellement aux variations climatiques (Toure *et al* 1998; Bayoh *et al* 2001). Au Burkina Faso, on rencontre les formes Mopti et Savane (Petricarca *et al* 1986). Le développement d'outils moléculaires d'identification a permis de définir deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* (della Torre *et al* 2001) qui correspondent au Burkina Faso, aux formes chromosomiques Mopti et Savane respectivement (Favia *et al* 1997). Les formes moléculaires M et S présentent des préférences écologiques différentes. Les *An. gambiae* S se développent préférentiellement dans des gîtes larvaire typiques temporaires alors que les *An. gambiae* M se retrouvent majoritairement dans les gîtes anthropiques semi-permanents ou permanents (Favia *et al* 1997; della Torre *et al* 2001). Les flux de gène semblent limités entre les formes moléculaires M et S qui présentent des sensibilités différentes aux différents insecticides, notamment aux pyréthrinoïdes (Diabate *et al* 2003; Diabate *et al* 2004).

1.1.2 Rôle vectoriel

L'importance vectorielle du complexe *An. gambiae* ne peut être dissociée de l'adaptation des membres de ce complexe à prendre leur repas sanguin sur l'homme. C'est en effet lors du prélèvement d'un repas de sang sur un individu porteur du parasite que l'anophèle va s'infecter ou transmettre des germes pathogènes. Le complexe *An. gambiae* constitue un système vectoriel complexe par rapport à la multitude d'espèces et de formes adaptées aux diverses conditions de l'habitat. Deux paramètres sont déterminants pour qualifier un moustique de bon vecteur de parasites. Il s'agit de la compétence vectorielle, déterminée essentiellement par la compatibilité vecteur/parasite, et de la capacité vectorielle, déterminée par l'anthropophilie et la longévité du vecteur.

1.2 Les stratégies de lutte contre les *An. gambiae*

La lutte contre la transmission du paludisme par les membres du complexe *gambiae* tend à diminuer soit leur compétence vectorielle, soit leur capacité vectorielle. Nous ne développerons pas dans

ce travail l'axe de recherche qui consiste à diminuer la compatibilité vecteur-parasite, par un contrôle génétique par exemple et ainsi réduire la compétence vectorielle d'une population de vecteurs (Varmus *et al* 2003; Clayton 2006). D'une manière générale, diminuer la capacité vectorielle peut être envisagé par différentes stratégies de lutte, généralement classées selon le facteur de transmission qu'elles touchent. En effet, certaines méthodes ont pour objectif de réduire la densité de moustiques (§ 1.2.1) ou la longévité des femelles adultes (§ 1.2.2) tandis que d'autres visent à réduire le contact homme-vecteur (§ 1.2.3). Mais le choix de l'une ou l'autre doit tenir compte de la bioécologie des espèces visées, de leur comportement et du contexte épidémiologique dans lequel s'effectue la transmission de la maladie.

1.2.1 Lutte anti-larvaire

La plupart des méthodes de lutte visant à réduire la production de moustiques nécessitent le traitement des gîtes larvaires. Néanmoins, une lutte anti-larvaire bénéfique au plan épidémiologique contre le paludisme implique une réduction quasi totale des gîtes à anophèles, principalement dans les zones de paludisme stable où la transmission peut être assurée par un petit nombre de vecteurs. Or les caractéristiques des gîtes larvaires des espèces vectrices *An. gambiae* et *An. arabiensis* (nombreux et temporaires) ne permettent pas l'utilisation des méthodes de lutte anti-larvaire quelles qu'elles soient (aménagement de l'environnement, lutte biologique, lutte chimique). Néanmoins de rares exemples de contrôle efficace utilisant des poissons larvivores culiciphages ont été observés dans des zones de paludisme instables, où les gîtes larvaires étaient limités et facilement repérables (Louis & Albert 1988).

1.2.2 Lutte adulticide

La principale méthode de lutte « imagocide » est l'aspersion intradomiciliaire. Cette technique est encore utilisée en Afrique pour lutter contre les vecteurs du paludisme endophiles et anthropophiles comme *An. funestus* et *An. gambiae*. Le DDT fut longtemps l'insecticide de choix pour les aspersions de par sa rémanence et son efficacité contre les moustiques et autres insectes nuisibles (cafards et punaises par exemple). Cependant, il fut petit à petit remplacé par des insecticides moins rémanents dans l'environnement comme certains organophosphorés (malathion), carbamates (bendiocarb) ou pyréthrinoïdes (perméthrine). Les traitements intradomiciliaires présentent cependant l'inconvénient de ne pas éliminer les moustiques les plus exophages et/ou exophiles (i.e. *An. arabiensis* § 1.1.1), qui continuent de prendre des repas sanguins, assurant ainsi un niveau minimal de transmission.

1.2.3 Réduction du contact homme-vecteur

Cette stratégie vise à établir une barrière (physique et/ou chimique) entre l'homme et le moustique. Les moustiquaires sont utilisées depuis longtemps pour se protéger des piqûres de moustiques (Snow *et al* 1987). Leur efficacité s'est vu renforcée lorsqu'elles ont été imprégnées d'insecticides (Darriet *et al* 1984), ajoutant à la barrière physique, un effet répulsif et létal. En effet, l'effet répulsif des pyréthrinoïdes empêche le moustique de se gorger au travers de la moustiquaire et d'y pénétrer lorsque

celles-ci sont trouées après un certain temps d'utilisation. L'effet létal sur les moustiques contribue quant à lui à la protection communautaire conférée par les moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII). En effet, avec une couverture de la population supérieure à 80%, elles entraînent une diminution de la transmission palustre (« effet de masse ») en réduisant la densité vectorielle, la durée de vie du moustique, ainsi que les indices sporozoïtiques (Lengeler 2004). Cependant, pour que les moustiquaires puissent être acceptées par les communautés, il est indispensable qu'elles protègent efficacement contre les autres insectes nuisibles tels que les *Culex*, les poux, les punaises ou les blattes (Mouchet *et al* 2004), que leur prix soit accessible à l'ensemble de la population, et qu'il n'y ait pas besoin de ré-imprégnier la moustiquaire (Lines 1996). C'est pourquoi, depuis quelques années, des moustiquaires à « longue durée d'action » (Long Lasting Nets : LLN) sont disponibles sur le marché et présentent l'avantage de ne nécessiter aucun retraitement durant la durée de vie de la moustiquaire, estimée à 4 ou 5 ans (Guillet *et al* 2001).

1.3 Les insecticides

Les cibles potentielles des insecticides sont nombreuses : système nerveux central, le métabolisme respiratoire ou métabolisme hormonal (Annexe 1).

Cependant, seules quatre familles de produits chimiques représentent plus de 10% de part de marché chacune et plus de 70% de l'ensemble : les organophosphorés (à partir de 1940), les carbamates (à partir de 1950), les pyréthrinoïdes de synthèse (à partir de 1970) et les néonicotinoïdes (à partir de 1990) (Nauen 2006). La cible principale de ces insecticides est le système nerveux des insectes, en effet près de 90% des insecticides utilisés sont neurotoxiques. Ils agissent sur les canaux ioniques voltage-dépendants, à l'origine de l'activité nerveuse, ou sur les récepteurs ionotropes, altérant la transmission synaptique, relais de l'information nerveuse (Figure 2).

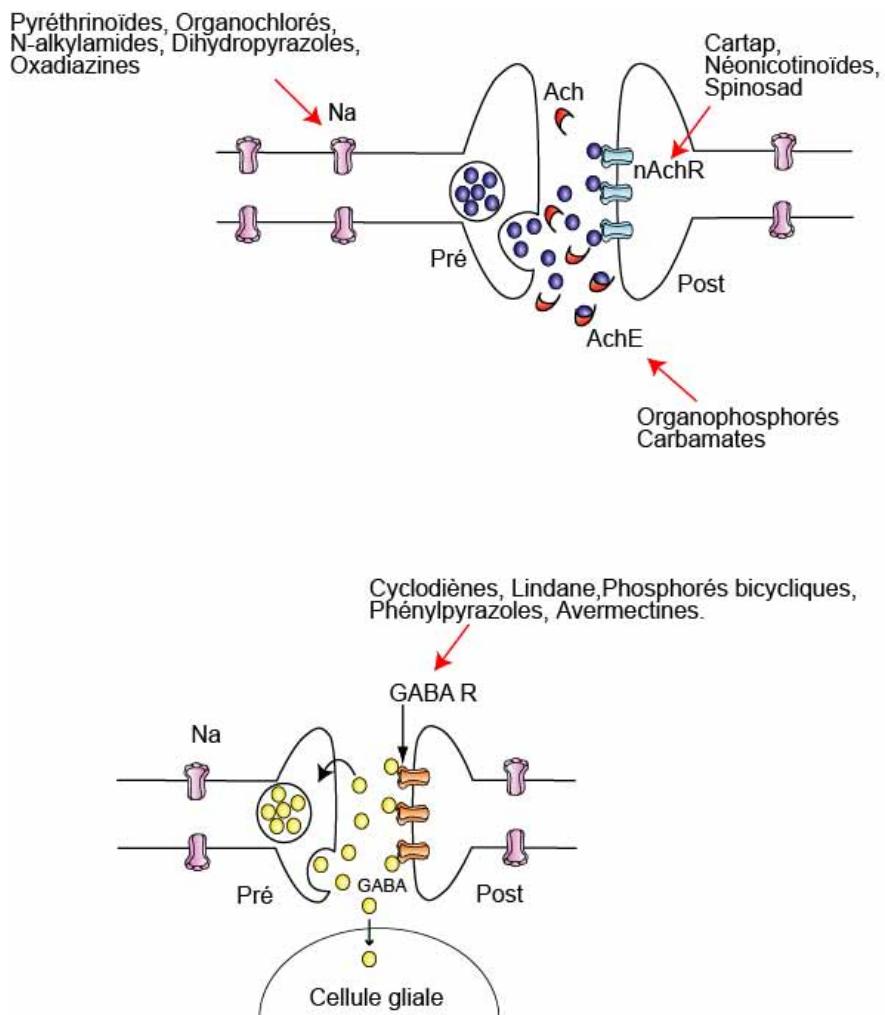


Figure 2 :

A : Représentation schématique d'un neurone et d'une synapse cholinergique avec les cibles principales des insecticides. ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase ; AChR : récepteur cholinergique de type nicotinique. N : noyau ; Na : canal sodium ; Pré : élément présynaptique ; Post : élément postsynaptique ; RyR : récepteur à ryanodine (Modifié d'après (Raymond-Delpech *et al* 2005)).

B : Représentation schématique d'une synapse GABAergique avec les cibles principales des insecticides. GABA : acide γ -aminobutyrique ; GABAR : récepteur au GABA ; Na : canal sodium ; Pré : élément présynaptique ; Post : élément postsynaptique (Modifié d'après (Raymond-Delpech *et al* 2005))).

Les organophosphorés et les carbamates inhibent l'acétylcholinestérase, l'enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine après la transmission de l'information par ce neurotransmetteur (Figure 2). Si cette hydrolyse n'a pas lieu, l'augmentation d'acétylcholine induit une hyperactivité aboutissant à la mort de l'insecte.

Les pyréthrinoïdes sont des modulateurs des canaux sodium voltage-dépendants qui sont à l'origine de la phase de dépolarisation des potentiels d'action. Les pyréthrinoïdes sont classés en deux

groupes selon leur structure chimique et leur mode d'action. Structurellement, la différence clé entre les groupe I et II est l'absence ou la présence, respectivement, d'une liaison alpha-cyanée. Les travaux sur la blatte américaine, qui a servi de modèle d'étude, ont permis de montrer que, suite à l'application de pyréthrinoïdes sur un axone de cette blatte, le courant sodium ne s'inactivait plus totalement et les queues de courant ainsi induites avaient des constantes de temps de plusieurs millisecondes (Pelhate 1985). De plus, ils déplaçaient l'activation vers des potentiels plus négatifs. Par conséquent, davantage d'ions sodium traversaient la membrane et la dépolarisaient (Bloomquist 1996; Zlotkin 1999; Narahashi 2000; Shafer *et al* 2005).

Les pyréthrinoïdes de type II ralentissent plus longtemps l'inactivation des canaux sodium que ceux de type I. Les pyréthrinoïdes de type I inactivent les canaux justes assez pour provoquer une activité répétitive alors que ceux de type II la prolonge sur des périodes suffisamment longues pour que la membrane se dépolarise. Cette dépolarisation cause une diminution du gradient électrochimique du sodium ce qui entraîne une diminution de l'amplitude des potentiels d'action puis la perte de l'excitabilité neuronale (Bloomquist 1996; Zlotkin 1999; Narahashi 2000; Shafer *et al* 2005). Cette action neurotoxique provoque une transmission répétée ou continue de l'influx nerveux, qui aboutit à des convulsions puis à la tétanie de l'insecte.

Les organophosphorés et les pyréthrinoïdes sont les principaux insecticides utilisés en santé publique depuis l'interdiction du DDT en 1972. Il faut noter que le DDT est tout de même encore utilisé (et même recommandé) en aspersions intra-domiciliaires en Afrique sub-saharienne (Rogan & Chen 2005; Overgaard & Angstreich 2007). Les pyréthrinoïdes sont les seuls insecticides recommandés pour l'imprégnation des moustiquaires en raison de leur rapidité d'action à faible dose (effet knock-down ou KD), leur effet excito-répulsif et leur innocuité pour l'homme (Zaim *et al* 2000).

1.4 La résistance aux insecticides

La toxicité des insecticides résulte de leur interaction avec leur cible biologique présente chez l'insecte. La molécule insecticide doit entrer en contact avec l'insecte, pénétrer dans l'organisme, dans certains cas être transformé en métabolite actif, puis être transporté jusqu'à sa cible. Tout mécanisme qui modifie l'une de ces étapes peut donc conduire à une résistance (Soderlund & Bloomquist 1989). Celle-ci peut impliquer une modification du comportement de l'insecte qui évite ainsi le contact avec l'insecticide, une modification de l'absorption ou de l'excrétion de l'insecticide, une modification des voies métaboliques permettant sa dégradation ou enfin une modification de sa cible (Figure 3)(IRAC 2006).

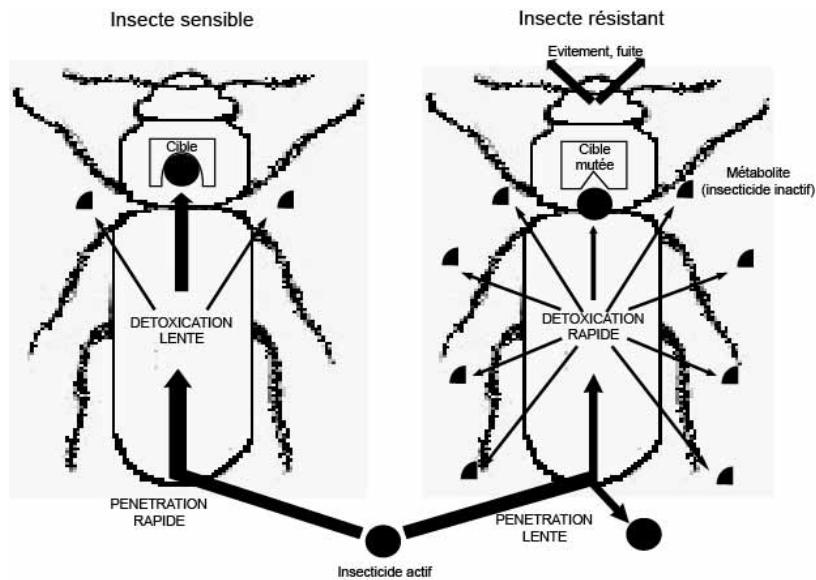


Figure 3 : Représentation schématique des différents mécanismes de résistance aux insecticides chez les insectes.

Les résistances aux deux principales familles d'insecticides (organophosphorés et pyréthrinoïdes) utilisées dans la lutte contre le paludisme sont de deux types : résistance métabolique et résistance par modification de cible.

1.4.1 Résistance métabolique

La résistance métabolique est due à l'accroissement de l'activité d'enzymes assurant la détoxication des insecticides, essentiellement des estérases, des oxydases à cytochrome P-450 et des glutathion-S-transférases (Oppenorth 1985). Cet accroissement peut provenir soit d'une modification de la conformation de l'enzyme la rendant plus efficace soit d'une production accrue de protéine (Vaughan & Hemingway 1995) pouvant parfois représenter jusqu'à 12% des protéines totales d'un individu (Fournier *et al* 1987). La surproduction d'enzymes peut être due à une modification d'un gène régulateur contrôlant le degré d'expression de l'enzyme (Mouches *et al* 1987; David *et al* 2005), à une augmentation du nombre de copies du gène qui code pour ces enzymes (Hemingway *et al* 2004).

1.4.2 Modification de cible

Les cibles principales des pyréthrinoïdes et des organophosphorés sont des protéines (canaux ioniques ou enzymes) jouant un rôle dans la transmission de l'influx nerveux, le canal sodium, ou l'acétylcholinestérase. Des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant pour ces protéines cibles entraînent des modifications structurales ayant pour conséquence de diminuer leur affinité avec les insecticides. Ces mécanismes peuvent d'ailleurs être à l'origine de résistances croisées à tous les insecticides qui agissent sur cette cible. Chez la plupart des espèces d'insectes, les mêmes points de mutations se retrouvent généralement sur les gènes codant pour ces protéines, de par le fait que le changement d'acide

aminé doit non seulement réduire l'affinité de l'insecticide avec la cible mais aussi préserver les fonctions initiales de la protéine à un niveau compatible avec la survie de l'insecte.

Le canal sodium

Cette protéine comporte quatre domaines homologues répétés comprenant chacun six segments hydrophobes transmembranaires. La résistance de type *kdr* (knock-down resistance) est due au remplacement d'un acide aminé (leucine en phénylalanine) dans le sixième segment du domaine II du canal sodium. Elle se caractérise par une diminution d'affinité entre l'insecticide et son site de fixation (Pauron *et al* 1989). On retrouve cette mutation chez de nombreuses espèces de moustiques dont, *An. gambiae* (Martinez Torres *et al* 1998), *Cx. quinquefasciatus* (Chandre *et al* 1998), *Ae. aegypti* (Hemingway *et al* 1989) et *An. stephensi* (Vatandoost *et al* 1996). Cependant, une autre mutation de la leucine en sérine à la même position est à l'origine d'une faible résistance à la perméthrine et au DDT chez les populations d'*An. gambiae* d'Afrique de l'Est (Ranson *et al* 2000). Chez certaines souches de mouches domestiques, un second point de mutation de la méthionine en thréonine entraîne un taux de résistance plus élevé (environ 500 fois) aux pyréthrinoïdes alpha-cyanés lorsqu'elle est associée à la mutation *kdr* (Leu/Phe) (Williamson *et al* 1996). D'autres points de mutation ont été décrits chez certaines espèces de moustiques notamment *Ae. aegypti* (Brengues *et al* 2003).

L'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acétylcholine (ACh), le principal neurotransmetteur chez les insectes (Pitman 1971). Elle est la cible principale des insecticides organophosphorés (OPs) et des carbamates. La résistance provient soit d'une augmentation de la quantité d'AChE (Fournier *et al* 1992; Fournier & Mutero 1994) soit d'une diminution de l'affinité de celle-ci avec ces insecticides (Soderlund & Bloomquist 1989). Chez *D. melanogaster* et *M. domestica*, quatre points de mutation situés sur le gène *Ace-2* rendent l'acétylcholinestérase moins sensible à l'action inhibitrice des insecticides (Mutero *et al* 1994). Chez *Cx. quinquefasciatus*, *An. albimanus* et *An. gambiae*, la même mutation glycine / sérine se retrouve en position 119 sur le gène *Ace-1* et confère une résistance croisée aux OPs et aux carbamates (Weill *et al* 2003). Chez *Cx. quinquefasciatus*, l'acétylcholinestérase insensible (*Ace-1^R*) s'avère être beaucoup moins efficace à dégrader les substrats que celle des individus sensibles (Bourguet *et al* 1997b; Bourguet *et al* 1997a). Des études récentes ont d'ailleurs montré que le coût de l'allèle résistant est fort et peut affecter de nombreux traits de vie (développement larvaire, compétition sexuelle, taux de prédation) (Berticat *et al* 2002; Agnew *et al* 2004). Il existe de nombreux autres points de mutation sur l'acétylcholinestérase dont certains confèrent une résistance aux OPs et aux carbamates (Fournier 2005; Alout *et al* 2007)

1.4.3 Impact de la résistance sur les programmes de luttes contre *An. gambiae*

L'efficacité d'une méthode de lutte contre les vecteurs du paludisme et notamment *An. gambiae* est généralement évaluée sur le plan entomologique, et ensuite d'un point de vue épidémiologique (Fegan *et al* 2007). Jusqu'à présent aucune étude épidémiologique n'a démontré une quelconque diminution de l'efficacité des moustiquaires imprégnées ou des aspersions intra-domiciliaires due à ces mécanismes de résistance. Une étude récente réalisée dans des villages du nord de la Côte d'Ivoire avec des moustiquaires imprégnées de lambda-cyhalothrine sur une population d'*An. gambiae* fortement résistante aux pyréthrinoïdes (fréquence du Kdr d'environ 90%) a permis de réduire la prévalence des porteurs asymptomatiques de 12 % pour une protection contre le paludisme estimée à 56%, i.e. réduisant de plus de deux fois le nombre d'accès palustres chez les enfants de moins de 5 ans (Henry *et al* 2005). Cette protection s'est avérée comparable à celle conférée par des moustiquaires imprégnées de lambda-cyhalothrine dans une région de Sierra Leone où les populations anophéliennes étaient sensibles aux pyréthrinoïdes (Marbiah *et al* 1998).

D'un point de vue entomologique, l'évaluation de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides, tant en zone sensible que résistante aux pyréthrinoïdes, a beaucoup été étudiée. Selon plusieurs auteurs (Chandre *et al* 2000; Corbel *et al* 2004b), les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes, moins sensibles à l'effet irritant, resteraient plus longtemps sur la moustiquaire et absorberaient en conséquence par contact tarsal une dose d'insecticide plus importante, ce qui expliquerait des taux de mortalité sensiblement identiques entre moustiques sensibles et moustiques résistants (Darriet *et al* 1998; Darriet *et al* 2000). Néanmoins en 2004, une étude rapporte une diminution de la mortalité d'individus homozygotes résistants pour le *Kdr* en contact avec des tissus imprégnés de pyréthrinoïdes (Corbel *et al* 2004b). Plus récemment, une évaluation menée au Bénin a montré que l'efficacité de moustiquaires imprégnées de lambda-cyhalothrine était considérablement réduite en zone de résistance (N'Guessan *et al* 2007). Les résultats ont en effet montré que la mortalité induite par les MII passait de 98% en zone sensible à 30% en zone résistante.

Bien que ces résultats méritent d'être confirmés dans d'autres contextes entomologiques, la résistance aux pyréthrinoïdes pourrait s'avérer être un véritable obstacle au bon fonctionnement des programmes de lutte contre le paludisme basés sur l'utilisation massive de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes.

1.4.4 Gestion de la résistance

Les stratégies de gestion de la résistance visent à prévenir, retarder, ou limiter le développement d'individus résistants au sein d'une population cible. Pour y parvenir, il est indispensable, d'une part, de disposer d'outils moléculaires et biochimiques permettant la détection précoce des mécanismes de résistance dans les populations de vecteurs et, d'autre part, de connaître les facteurs intrinsèques et

extrinsèques capables d'influencer l'évolution de la résistance sur le terrain. La dynamique de la résistance aux insecticides est un processus complexe qui dépend d'un certain nombre de facteurs biologiques, génétiques et opérationnels (Georghiou & Taylor 1977; Georghiou 1980). Les facteurs biologiques concernent directement le cycle de vie de l'insecte cible (nombre moyen de descendants, durée moyenne des générations) ainsi que son écologie (structuration des populations, taux de migration). Les facteurs génétiques englobent les propriétés des gènes de résistance eux-mêmes : nombre de gènes impliqués (monogénique *versus* polygénique), leur caractère dominant ou récessif, leurs interactions et leur valeur adaptative en présence ou en absence d'insecticide. Enfin, les facteurs opérationnels se rapportent à tout ce qui concerne les traitements : nature des produits utilisés, rémanence, doses employées, fréquence et mode d'application, ainsi que l'étendue et l'homogénéité des traitements.

En pratique, les stratégies développées pour contrôler la résistance sont élaborées avant tout au niveau opérationnel (Leeper *et al* 1986). Elles ont pour objectif de prévenir la résistance ou de ralentir son développement afin d'éviter qu'elle ne soit à l'origine d'échecs opérationnels. D'une manière générale, trois méthodes de gestion de la résistance sont pratiquées, i) la gestion par modération (maintien de la population sensible), ii) la gestion par saturation (doses augmentées afin d'atteindre les hétérozygotes) et iii) l'utilisation de combinaisons d'insecticides. La pression de sélection qui est à l'origine du développement de la résistance des moustiques vecteurs du paludisme est principalement d'origine agricole (Diabate *et al* 2002). Par ruissellement ou contact direct, les traitements agricoles entraînent la présence de résidus d'insecticides dans les gites à anophèles. Néanmoins il est difficilement envisageable de réduire le rythme des traitements agricoles pour maintenir une population sensible de moustique (*i.e.* modération). De plus, les doses d'insecticides utilisées sur les cultures sont très largement supérieures à celles appliquées sur les moustiquaires. La gestion par saturation n'est donc pas envisageable non plus. Dans le contexte de la lutte contre les vecteurs du paludisme, la seule stratégie qui puisse permettre le maintien de l'efficacité des traitements est l'utilisation de combinaisons d'insecticides.

Cette stratégie repose sur l'utilisation « combinée » d'insecticides ayant un mode d'action différent (Taylor & Georghiou 1979). Les insecticides peuvent être utilisés de façon simultanée (mélanges), ou alternée dans le temps (séquences, rotations) et dans l'espace (mosaïques) (Tabashnik 1989). De nombreux modèles théoriques ont démontré, dans des conditions très standardisées (coût du gène de résistance élevé, forte migration, etc.), la faisabilité de prévenir ou de ralentir l'évolution de la résistance en utilisant l'une ou l'autre de ces stratégies (Tabashnik & Croft 1982; Curtis 1985; Via 1986).

Les mélanges d'insecticides se basent sur l'hypothèse que si la probabilité de voir apparaître une résistance à l'un des composés du mélange est un évènement rare et indépendant, alors la probabilité de voir apparaître une résistance à plusieurs composés de l'association est extrêmement rare (Curtis 1985). L'intérêt fondamental de cette stratégie vient du fait que chaque insecticide du mélange va pouvoir éliminer les individus qui lui sont génétiquement sensibles (Comins 1986; Roush 1993).

En agriculture, l'utilisation de mélanges pyréthrinoïdes - organophosphorés semble avoir permis de prévenir pendant plus de 20 ans le développement de la résistance chez le principal ravageur du coton *Helicoverpa armigera* en Afrique de l'Ouest (Martin *et al* 2000). En santé publique, les cas concrets de gestion raisonnée de la résistance sont plutôt rares à ce jour. On retiendra celui du programme OCP (Onchocerciasis Control Program) en Afrique de l'Ouest, dans lequel une rotation systématique d'insecticides chimiques et biologiques a permis de bloquer l'évolution de la résistance aux organophosphorés chez les larves de simulies (Kurtak 1990; Hougard *et al* 1993).

Les perspectives de valoriser les mélanges d'insecticides pyréthrinoïdes / carbamates ou OPs ont fait l'objet d'études récentes (Corbel *et al* 2002; Corbel *et al* 2003; Darriet *et al* 2003; Corbel *et al* 2004a; Darriet *et al* 2005; Corbel *et al* 2006). Ces études ont montré que les moustiquaires bi-imprégnées de carbamates et de pyréthrinoïdes sont efficaces dans des zones où les anophèles sont résistants à ces insecticides (Hougard *et al* 2003; Asidi *et al* 2005) et ne sélectionnent pas les individus porteurs des gènes de résistance contrairement aux moustiquaires imprégnées de ces insecticides seuls (Corbel *et al* 2004b). Ils apparaissent donc comme un bon moyen de gestion de la résistance. Néanmoins, les mélanges carbamates/pyréthrinoïdes ne limitent pas plus le gorgement sur l'hôte dormant sous la moustiquaire que les produits utilisés seuls (Hougard *et al* 2003). Ceci signifie que la protection du « dormeur » n'est pas complètement assurée.

De la même manière, les matériaux imprégnés de carbamates et d'OPs, efficaces contre les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes, ont montré des perspectives intéressantes en matière de lutte anti-vectorielle (« mass killing effect »), mais leur faible effet excito-répulsif permet aux moustiques de rester plus longtemps sur la surface imprégnée et par conséquent de prendre plus facilement un repas de sang (Curtis & Mnzava 2000; Kolaczinski *et al* 2000; Fanello *et al* 2003; N'Guessan *et al* 2003). L'individu est donc moins protégé contre une piqûre infectante.

1.5 Les répulsifs

Les répulsifs représentent une large gamme de molécules d'origine végétale ou de synthèse qui présentent des propriétés excito-répulsives contre les insectes piqueurs. L'utilisation de répulsifs pour se protéger des insectes piqueurs est une pratique ancestrale qui mettait en jeu des dérivés de plantes. Actuellement, l'utilisation d'extraits de plantes fraîches, séchées ou brûlées est encore largement pratiquée en Afrique pour se protéger des insectes hématophages (Debboun *et al* 2007). Mais l'utilisation des répulsifs a connu un véritable développement avec l'apparition des produits de synthèse à action prolongée, non toxiques, acceptables en applications cutanées, et efficaces contre de nombreux insectes, plus particulièrement depuis la découverte du diéthyl-m-toluamide ou DEET en 1953 (McCabe *et al* 1954). Récemment, de nouvelles substances actives ont été commercialisées (IR3535¹, KBR 3023², et PMD³) et

¹ IR3535 : ethyl 3-(N-buthylacetylaminopropionate)

ont montré des performances intéressantes sur les insectes nuisants et/ou vecteurs de maladies (Nentwig 2003; Badolo *et al* 2004; Lundwall *et al* 2005).

Malgré l'augmentation considérable du marché des répulsifs sur le plan mondial (environ 1.7 milliards d'unités vendus en 2004/2005 pour un chiffre d'affaire de 5.6 milliards d'euros), ces composés n'ont jamais été utilisés en santé publique, en l'absence de preuves tangibles sur leur capacité à réduire la transmission de certaines maladies. Deux études menées en Asie (Rowland *et al* 2004b; Rowland *et al* 2004a) ont démontré que l'utilisation de DEET sur la peau procurait un niveau de protection contre le paludisme comparable à celui conféré par les moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes ou des pulvérisations intra-domiciliaires d'insecticides. Un autre essai de terrain réalisé au Burkina Faso a également montré que l'application de répulsifs pouvait réduire significativement le nombre de piqûres infectantes à *P. falciparum*, agent responsable de la forme grave du paludisme (Costantini *et al* 2004). Les répulsifs risquent donc de jouer un rôle croissant en santé publique dans les prochaines années, en particulier dans les zones où la biologie et le comportement des vecteurs rendent moins favorables l'utilisation de méthodes conventionnelles (régions où les vecteurs sont exophiles, exophages comme en Asie du Sud Est, Amérique du Sud, ou dans l'Océan indien).

1.5.1 Mode d'action des répulsifs

Malgré l'intérêt grandissant de la communauté scientifique à utiliser les répulsifs en santé publique (Gubler 2004; BEH 2006), une question majeure persiste concernant leur mode d'action chez les insectes. Certains auteurs ont suggéré que les répulsifs pouvaient bloquer les pores au niveau antennaire et ainsi empêcher la détection des stimuli émis par l'hôte (Wright 1975). D'autres auteurs ont attribué l'effet répulsif du DEET à son interaction avec les composants lipidiques de la membrane cellulaire (McIver 1981). Davis (Davis 1985) a proposé différents modèles d'activité neuronale pour les cinq types de segment sensoriel situés au niveau antennaire. Il a identifié au moins cinq modes d'action potentiels : (i) inhibition d'un signal attractif ; 2) inversion de la perception du signal attractif en un message irritant ; 3) activation d'un récepteur qui pourrait « brouiller » ou entraîner une réponse comportementale inappropriée; 4) activation d'un récepteur « à odeur »; 5) activation de différents récepteurs causant simultanément la perte du signal spécifique lié à la localisation de l'hôte (les répulsifs bloqueraient le système d'information sensoriel). Une étude récente a montré que le DEET ne repoussait pas les moustiques mais inhibait l'attraction en interférant avec les récepteurs à l'acide lactique impliqués dans la localisation de hôte (Dogan *et al* 1999). Malgré le nombre important de publications se référant aux "répulsifs" et aux "moustiques" (plus de 320 citations dans Medline dont 66 ces 2 dernières années), très peu d'études ont jusqu'à présent identifié précisément les mécanismes par lesquels les répulsifs perturbent la localisation de l'hôte et/ou empêchent les insectes de piquer.

² KBR3023 : Bayrepel or 2-(2-hydroxyethyl)-1- piperidinecarboxylic acid 1-methylpropyl ester

³ PMD : dimethylphthalat

1.5.2 Efficacités comparées

Il est très difficile de synthétiser les données bibliographiques concernant l'efficacité des répulsifs. En effet jusqu'à récemment, il n'existe pas de protocole standardisé et les sources de variabilité de l'efficacité des répulsifs sont multiples : conditions expérimentales, espèces d'insectes testées, choix des hôtes utilisés, doses appliquées, etc. Aujourd'hui, trois protocoles standardisés ont été proposés par l'OMS et l'« American Society of Tropical Medicine and Hygiene » (Barnard 2005; Barnard *et al* 2007). Toutefois, une revue concernant l'ensemble des évaluations de l'efficacité du DEET, du KBR 3023 et de l'IR3535 est disponible dans les chapitres 16, 18 et 21 dans « Repellents : Principles, Methods and Uses» (Debboun *et al* 2007). Le DEET semble encore être l'un des répulsifs les plus efficaces (Roberts & Reigart 2004; Debboun *et al* 2007). Le KBR 3023 et le DEET ont une efficacité comparable contre *Ae. aegypti*, le vecteur de la dengue et la fièvre jaune, et *An. gambiae*, le vecteur majeur du paludisme. Néanmoins les doses efficaces de ces deux répulsifs sont plus importantes pour se protéger des piqûres d'*An. gambiae* (Badolo *et al* 2004). KBR 3023 et le DEET semblent tous les deux plus efficaces que l'IR3535 (Badolo *et al* 2004; Costantini *et al* 2004).

1.5.3 Répulsifs et moustiquaires imprégnées

Les propriétés répulsives et/ou irritantes des répulsifs en imprégnation de vêtements ou de moustiquaires peuvent être intéressantes pour conférer un effet protecteur. En 1967, des expériences sur l'efficacité de morceaux de moustiquaires imprégnées de différents répulsifs et positionnés aux ouvertures d'une habitation ont été réalisées. Les meilleurs répulsifs préviennent l'entrée de 90% des moustiques pendant deux à trois mois (Gouck *et al* 1967). Ces résultats prometteurs n'ont pas pour autant été poursuivi d'un grand nombre d'études (Gouck & Moussa 1969). Récemment, une étude en cases expérimentales réalisée en Côte d'Ivoire a montré que des moustiquaires imprégnées d'une solution alcoolique de DEET ou d'IR3535 ont conféré une efficacité importante en terme d'inhibition du gorgement et, plus surprenant, en terme de mortalité sur *Culex quinquefasciatus* et *An. gambiae* (N'Guessan *et al* 2006). De plus, ces solutions alcooliques de DEET et d'IR3535, efficaces seulement quelques heures lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, protègent de plus de 70% des piqûres pendant 6 semaines (Badolo 2004). Ce dernier a montré que des moustiquaires imprégnées de DEET et de KBR 3023 conférait une bonne protection pendant environ 2 mois. Ces études relancent l'intérêt d'utiliser les répulsifs pour l'imprégnation de moustiquaire.

1.6 Présentation du travail de thèse

L'objectif général de ce travail de thèse est d'étudier les potentialités offertes par l'association sur des moustiquaires de répulsifs et d'insecticides non-pyréthrinoïdes pour la gestion de la résistance aux pyréthrinoïdes chez les vecteurs du paludisme. Au cours d'une première partie, nous exposerons les études de laboratoire visant à caractériser les interactions entre les organophosphorés ou les carbamates et deux répulsifs, le DEET et le KBR 3023. La seconde partie de l'étude portera sur l'évaluation en cases expérimentales de moustiquaires imprégnées de deux mélanges dans lesquels le pyrimiphos-méthyl, un insecticide de la famille des organophosphorés, est mélangé au DEET ou au KBR 3023 sur des populations naturelles d'*An. gambiae sl.* Dans cette partie, l'efficacité des mélanges sera comparée à celle d'une moustiquaire imprégnée d'une formulation standard de deltaméthrine (KO-Thrin®). L'analyse d'un échantillon des anophèles récoltés lors de ces évaluations permettra ensuite d'étudier l'impact de ces mélanges sur l'évolution des gènes de résistance *Kdr* et *Ace1^R*. Dans la troisième partie, une étude multidisciplinaire tentera de décrire les mécanismes physiologiques impliqués dans le mode d'action du DEET sur le système nerveux central des insectes.

2 ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES INSECTICIDES CARBAMATES OU ORGANOPHOSPHORES ET LES REPULSIFS

Seuls les pyréthrinoïdes sont utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires car ils possèdent des caractéristiques entomologiques nécessaires à la protection de l'utilisateur (effet excito-répulsif) et à la protection communautaire (effet insecticide). En associant un insecticide non-pyréthrinoïde et un répulsif sur une moustiquaire, notre objectif était de maintenir l'efficacité insecticide contre des moustiques résistants aux pyréthrinoïdes et de recréer l'effet excito-répulsif propre aux pyréthrinoïdes. L'utilisation en mélange de plusieurs molécules actives peut donner lieu à différentes interactions (cf. effet additif / synergie / antagonisme⁴). Nous avons donc étudié au laboratoire les interactions entre insecticides non-pyréthrinoïdes et répulsifs et leurs influences sur les critères d'efficacité recommandés par l'OMS en utilisant les méthodes standards d'évaluation des insecticides (WHO 2006).

2.1 Interactions entre le DEET et le propoxur sur le modèle biologique *Ae. aegypti*: mortalité, effet knock-down et irritabilité

Article 1 : Pennetier C, Corbel V and Hougard JM. 2005. *Combining a non-pyrethroid insecticide and a repellent : a new approach for controlling Kdr resistant mosquitoes.* Am J Trop Med Hyg 72 (6), 739-744.

Pour la première étude, nous avons choisi d'utiliser le propoxur, insecticide de la famille des carbamates, connu pour sa forte efficacité insecticide et son faible effet irritant et le Diéthyl-m-Toluamide ou DEET. Nous avons étudié les interactions entre les molécules actives grâce à deux méthodes standardisées : le test en tube OMS et le test d'irritabilité (Méthodes détaillées en Annexe 9) (WHO 2006) ; lesquelles permettent de déterminer la mortalité induite, l'effet knock down (KD) et l'effet irritant. Afin d'observer tout type d'interaction (effet additif / synergie / antagonisme), nous avons déterminé la dose de propoxur létale pour 30% des moustiques exposés ($CL_{30}=36 \text{ mg/m}^2$). A cette dose de propoxur, nous avons ajouté la dose de DEET la plus irritante. Cette dose de 364 mg/m^2 est la dose maximale pour laquelle nous n'avons pas observé de mortalité (CL_0). Nous avons ensuite évalué la mortalité, l'effet KD et l'effet irritant des ces molécules seules et en mélange, en comparaison avec la dose de deltaméthrine létale pour la totalité (CL_{100}) des moustiques sensibles aux pyréthrinoïdes exposés (5 mg/m^2).

Sous l'hypothèse d'indépendance d'action de chacune des molécules, nous nous attendions à une faible mortalité (de l'ordre de 30%), à l'absence d'effet KD et une forte irritabilité. Le mélange de DEET et de propoxur a induit 96% de mortalité, un fort effet KD ($KDT_{50}=36.6\text{min}$) et une forte irritabilité. Ces

⁴ Trois types d'interactions peuvent se manifester lorsque deux composés sont combinés :

- Effet additif, où l'effet combiné des deux composés du mélange est égal à la somme des effets des deux produits pris séparément [$AB = A + B$]
- Effet synergiste, où l'effet combiné des deux insecticides est significativement plus fort que celui attendu par sommation [$AB > A + B$]
- Effet antagoniste, où à l'inverse, l'effet des produits combinés est inférieur à celui attendu par sommation [$AB < A + B$]

résultats significativement supérieurs à ceux attendus indiquent une forte synergie entre le DEET et le propoxur. De plus, ils ne sont pas significativement différents de ceux induits par la deltaméthrine à la CL₁₀₀. Selon ces trois critères entomologiques, le mélange de DEET et de propoxur est donc aussi efficace que la deltaméthrine contre une souche d'*Ae. aegypti* sensibles aux pyréthrinoïdes.

Plus intéressant, lorsque les mêmes bio-essais ont été réalisés sur des moustiques homozygotes résistants pour le gène *Kdr*, l'efficacité du mélange de DEET et de propoxur est restée aussi élevée tandis que la deltaméthrine n'a induit que 9% de mortalité, aucun effet KD et un effet irritant réduit.

Ces résultats sont encourageants pour les raisons suivantes :

- Nous avons, en combinant le DEET au propoxur, reconstitué des effets insecticide et excito-répulsif comparables à ceux de la deltaméthrine.
- Le mélange a induit un effet KD caractéristique des pyréthrinoïdes. Cet effet est extrêmement important car il confère une rapidité d'action à la moustiquaire imprégnée et constitue un critère essentiel en terme de protection contre la piqûre.
- La forte synergie mise en évidence entre le propoxur et le DEET peut permettre d'utiliser des doses réduites de carbamates.
- Ce mélange de DEET et de propoxur est resté très efficace contre des moustiques résistants aux pyréthrinoïdes par l'intermédiaire de la mutation *kdr*.

2.2 Interactions entre le pyrimiphos-méthyl et les répulsifs, DEET et KBR sur tissu moustiquaire contre *An. gambiae*

Article 2 : Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, Lapiel B, Hougard JM. 2007. *Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against Anopheles gambiae*. Malaria J, Mar 29;6(1) :38.

L'imprégnation des moustiquaires nécessite d'intégrer les matières actives insecticide et répulsive à une formulation afin de i) pouvoir mélanger à l'eau des molécules parfois hydrophobes, ii) et surtout de fixer les molécules actives dans et/ou sur la fibre. Dans cette seconde étude, nous avons évalué l'efficacité et la protection contre la piqûre d'*An. gambiae* d'échantillons de moustiquaires imprégnées de mélanges de formulations d'un insecticide non-pyréthrinoïdes et d'un répulsif dans un tunnel expérimental (Annexe 9). Ce tunnel est un dispositif qui permet de prendre en compte le comportement du moustique en présence d'un hôte vertébré. Ce dispositif, utilisé préalablement à une évaluation en conditions naturelles, permet d'estimer l'effet excito-répulsif, l'inhibition du gorgement et le taux de mortalité induits par une moustiquaire imprégnée en présence d'un appât animal (Annexe 9)(Chandre *et al* 2000).

Nous avons choisi de travailler avec le pyrmiphos-méthyl (PM), un insecticide du groupe des organophosphorés car il présente un profil toxicologique plus favorable que le propoxur (les DL₅₀ sur le rat du propoxur et du PM sont respectivement 50 mg/kg et 1414 mg/kg) (Tomlin 2007). Nous avons associé au PM le DEET ou le KBR 3023, un répulsif de synthèse récent qui montre des performances comparables à celles du DEET (cf. § 1.4.2). Néanmoins, selon les insecticides employés, les doses utilisées ou les cibles visées, des interactions variées (additif / synergie / antagonisme) peuvent se manifester. Nous avons donc étudié les interactions entre le PM et les deux répulsifs (DEET et KBR 3023) et leurs effets sur l'efficacité et la rémanence des moustiquaires traitées contre *An. gambiae*. Pour cela, nous avons utilisé une faible dose de PM (150 mg/m²) combinée à chacun des répulsifs, DEET et KBR 3023 à 10 g/m². Cette dose de 10 g/m² est du même ordre de concentrations que celles appliquées sur la peau. Nous avons ensuite testé l'effet protecteur et insecticide des moustiquaires imprégnées des formulations seules et en mélanges sur une souche d'*An. gambiae* de laboratoire dépourvue sensible aux insecticides.

Le PM, le DEET et le KBR 3023 utilisés seuls ont induit le jour de l'imprégnation (T₀) 100% de mortalité. L'efficacité insecticide de ces trois produits a diminué rapidement pour atteindre une activité résiduelle (< 20% de mortalité) moins d'un mois après l'imprégnation. Les deux mélanges (PM+DEET et PM+KBR 3023) ont également induit 100% de mortalité à T₀ mais cette efficacité s'est maintenue au dessus de 95% pendant plus de deux mois avant de diminuer plus lentement pour atteindre un niveau résiduel de 20%, 6 mois après l'imprégnation. De la même manière, l'inhibition du gorgement induite par les mélanges PM+DEET et PM+KBR 3023 a été plus importante et a duré plus longtemps que les produits utilisés seuls.

Tant au niveau de la mortalité que de l'inhibition du gorgement, la rémanence des mélanges a été significativement plus importante que la rémanence attendue sous l'hypothèse d'indépendance d'action des deux composés. Ceci indique une forte synergie entre le PM et le DEET ou le KBR 3023. La cible moléculaire des organophosphorés et celle des carbamates est la même : l'AChE (cf. § 1.3). Bien que les mécanismes responsables de la synergie entre le DEET et le propoxur ne soient pas connus, il n'est pas étonnant d'observer le même type d'interactions avec le PM. En revanche, les interactions synergistes entre le PM et le KBR 3023 n'avaient jamais été observées auparavant.

Pour conclure, ces différentes études en laboratoire ont permis de mettre en évidence des effets synergiques entre les carbamates ou les OPs et les répulsifs, et de recréer les effets insecticide, KD et irritant caractéristiques des pyréthrinoïdes. De plus, cette efficacité comparable à celle des pyréthrinoïdes est maintenue sur des moustiques résistants (homozygotes pour la mutation *Kdr*). Ces interactions synergiques permettent d'utiliser de faibles doses d'OPs, d'allonger la durée d'efficacité du tulle moustiquaire, et de proposer une alternative prometteuse aux seuls pyréthrinoïdes. Au vu des résultats obtenus en laboratoire (Phase I), les deux mélanges PM+DEET et PM+KBR présentent les critères d'efficacité et de rémanence requis pour évaluation en conditions naturelles (phase II) (WHO 2006).

3 ETUDE DE L'EFFICACITE EN CASES EXPERIMENTALES DE MOUSTIQUAIRES IMPREGNEES DE MELANGES OPS/REPULSIFS CONTRE *AN. GAMBIAE* SENSIBLES ET RESISTANTS AUX INSECTICIDES

Au vu des résultats mentionnés dans le chapitre 2, les deux couples de molécules PM+DEET et PM+KBR 3023 testés en tunnel expérimental (PM à 150 mg/m² ; DEET et KBR 3023 à 10 g/m²) ont été retenus pour une évaluation entomologique en conditions naturelles. Nous avons réalisé deux évaluations en cases expérimentales (Darriet *et al* 2002; WHO 2006) pour mesurer l'efficacité et la rémanence de moustiquaires imprégnées (MII) sur des populations naturelles de moustiques dans des conditions contrôlées sans imposer de contact forcé avec la moustiquaire (Annexe 9).

Les études ont été réalisées à Bama, une commune située à 30 km au nord de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. Les cases expérimentales dans lesquelles nous avons réalisé l'étude sont situées en bordure d'un large périmètre rizicole. Dans cette station, les populations anophéliennes sont composées des deux formes moléculaires d'*An. gambiae*, M et S. De plus ces populations sont porteuses des gènes de résistance *Kdr*⁵ et *Ace1R*⁶ dont les fréquences varient selon la saison. En mai et juin 2006 (le début de la saison des pluies), la forme moléculaire M était majoritaire à plus de 85% et les fréquences des gènes de résistance étaient très faibles (*Kdr* = 0.08 et *Ace1R* = 0.01). A l'inverse en fin de saison des pluies (septembre et octobre 2006), la forme moléculaire S était majoritaire à plus de 95% et les fréquences des gènes de résistance étaient plus élevées (*Kdr* = 0.88 et *Ace1R* = 0.40). Cette population présentait donc une forte résistance aux pyréthrinoïdes et aux organophosphorés.

L'efficacité des MII a été estimée par rapport à une case témoin (moustiquaire non traitée) en mesurant les indicateurs entomologiques suivants : 1) effet deterrent : réduction du nombre de moustiques trouvés dans la case traitée / case témoin ; 2) Exophilie : proportion de moustiques qui tentent de sortir de la case traitée / témoin ; 3) Inhibition du taux de gorgement : réduction du pourcentage de moustiques femelles gorgées dans la case traitée / témoin ; 4) mortalité globale : pourcentage de moustiques retrouvés morts dans la case traitée immédiatement après la capture et après 24h d'observation.

Les objectifs de ces études étaient les suivants :

- Etudier les interactions entre PM et les répulsifs DEET et KBR sur le comportement des populations naturelles d'*An. gambiae* sensibles et résistantes aux insecticides.

⁵ Le gène *Kdr* confère une résistance croisée aux pyréthrinoïdes et au DDT.

⁶ Le gène *Ace1R* qui confère une résistance croisée aux OPs et aux carbamates.

- Comparer l'efficacité de moustiquaires imprégnées des mélanges PM+DEET et PM+KBR 3023 avec une moustiquaire imprégnée d'une formulation standard de deltaméthrine (KO-Thrine®) sur des populations naturelles d'*An. gambiae* sensibles et résistantes aux insecticides.

- Etudier l'impact de l'utilisation de ces mélanges sur l'évolution des gènes de résistance *Kdr* et *Ace1^R*(§ 1.4.2).

3.1 Interactions entre le DEET ou le KBR et le pyrimiphos méthyl : synergie insecticide et modifications du comportement d'*An. gambiae*

Article 3 : Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapiel B, Chandre F, Hougard JM. 2007. *Synergy between repellents and Organophosphates on bed nets: Impact on nets' efficacy and behaviour of natural free-flying resistant An. gambiae mosquitoes in Burkina Faso*. En préparation

Pour la première fois, des interactions synergiques entre molécules à mode d'action différent ont été observées en conditions naturelles sur des *An. gambiae*. En effet, les interactions entre le PM et les répulsifs, DEET et KBR 3023, sont responsables d'une augmentation de l'exophilie, de l'inhibition du gorgement et de la mortalité par rapport aux moustiquaires imprégnées de chacun de ces produits. Le taux de mortalité induit par les deux mélanges ($>90\%$) est significativement plus élevé que celui induit par les produits seuls ($<55\%$), du moins pendant les premiers jours de l'évaluation contre les populations d'anophèles sensibles aux insecticides. Lorsque la population anophélienne est résistante aux insecticides le taux de mortalité induit par les mélanges est élevé ($>85\%$) contre moins de 50% pour les produits seuls. Une partie de l'efficacité insecticide des moustiquaires imprégnées des mélanges est donc due aux interactions positives entre le PM et les répulsifs DEET et KBR3023. Ces interactions synergiques augmentent le pouvoir protecteur contre la piqûre et l'exophilie induite par les moustiquaires imprégnées des mélanges

Les paramètres du modèle linéaire généralisé expliquant le mieux nos données montrent que l'efficacité insecticide des mélanges PM+DEET et PM+KBR 3023 ne semble pas dépendre des modifications de l'exophilie et du taux de gorgement. Ceci est plutôt encourageant car il est indispensable pour avoir un effet de masse que les moustiquaires tuent les vecteurs qui viennent à son contact. Les moustiquaires imprégnées des mélanges de PM et de DEET ou de KBR 3023 ont induit une forte mortalité, ont inhibé en partie le gorgement et ont repoussé les *An. gambiae* à l'extérieur de la case expérimentale. Il convient à présent de comparer ces critères d'efficacité avec ceux d'une moustiquaire imprégnée d'une formulation d'un pyréthrinoïde standard répondant aux exigences de l'OMS.

3.2 Efficacité comparée des mélanges PM/DEET et PM/KBR, avec une formulation standard de deltaméthrine contre *An. gambiae* résistants aux insecticides.

Article 4 : Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapiel B, Chandre F, Hougard JM. 2007. *A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than pyrethroid against multi-locus resistant Anopheles gambiae*. Soumis à Emerg Inf Dis

Nous avons comparé l'efficacité des mélanges PM+DEET et PM+KBR 3023 avec celle d'une formulation standard de deltaméthrine (KO-Thrine®) en terme de mortalité. L'efficacité des mélanges PM+DEET et PM+KBR s'est avérée comparable à celle de la deltaméthrine à une dose opérationnelle (25 mg/m²) contre les moustiques *An. gambiae* sensibles aux insecticides pendant 10 jours. Nous n'avons pas observé de différence significative d'efficacité des mélanges PM+DEET et PM+KBR3023 contre les populations d'*An. gambiae* sensibles ou résistantes aux insecticides. En revanche, la deltaméthrine a perdu une grande partie de son efficacité insecticide lorsqu'elle est utilisée contre la population d'*An. gambiae* résistantes aux insecticides (<50% de mortalité contre 90% contre les moustiques sensibles) au premier jour après le traitement de la moustiquaire. Ces résultats confirment les travaux réalisés au Bénin qui montrent une diminution de l'efficacité des pyréthrinoïdes en zone de résistance (Corbel *et al* 2004b; N'Guessan *et al* 2007). Les moustiquaires imprégnées de mélanges PM+DEET et PM+KBR sont donc plus efficaces que la deltaméthrine sur des populations naturelles d'*An. gambiae* résistantes aux OPs, carbamates et aux pyréthrinoïdes.

De plus, nous avons comparé la mortalité induite parmi les individus sensibles et résistants pour le gène *Kdr* et *Ace.1^R*. Le gène *Kdr* étant récessif, nous avons regroupé les individus RS et SS (phénotypes sensibles). Les mélanges PM+KBR et PM+DEET n'induisent pas plus de mortalité parmi les sensibles que parmi les résistants. Cela suggère que leur utilisation aura peu de chances de sélectionner le gène *Kdr*. La deltaméthrine n'induit pas non plus une mortalité supérieure chez les sensibles que chez les résistants avec une probabilité p=0.06. Il serait intéressant d'augmenter l'effectif de l'échantillon afin d'infirmer ou confirmer la sélection des individus résistants au *Kdr* par les moustiquaires imprégnées de deltaméthrine. Pour ce qui est du gène *Ace.1^R*, aucun des trois traitements n'a induit de mortalité inférieure chez les individus au phénotype résistant (les hétérozygotes) par rapport aux individus sensibles (homozygotes). Les moustiquaires imprégnées de mélanges PM+DEET et PM+KBR ne sélectionnent pas les individus porteurs des gènes *Kdr* et *Ace.1^R*.

En conclusion, les moustiquaires imprégnées de PM+DEET et PM+KBR peuvent donc constituer un outil intéressant de lutte contre les anophèles vecteurs et de gestion de la résistance. Néanmoins la volatilité des molécules utilisées dans cette étude et des formulations de répulsifs disponibles ne permettent pas actuellement d'envisager une utilisation sur le terrain. Il est à présent

nécessaire de développer des formulations de répulsifs plus rémanentes (micro-capsules, cyclodextrines, etc) ou une technologie « long-lasting » pour les répulsifs.

4 RECHERCHE DE FORMULATIONS REMANENTES DE REPULSIFS

Les mélanges d'insecticides non-pyréthrinoïdes et de répulsifs constituent une alternative « potentielle » aux pyréthrinoïdes. En effet, la limite majeure de cette nouvelle stratégie est la faible rémanence des répulsifs sur la moustiquaire (2 à 6 semaines en conditions naturelles selon les études) (N'Guessan *et al* 2006; Pennetier *et al* 2007b). Aussi, plusieurs laboratoires et compagnies industrielles cherchent à développer des formulations rémanentes de répulsifs en adaptant les technologies disponibles actuellement. Parmi elles, on compte les poudres mouillables, les concentrés émulsifiables, les suspensions concentrées et les formulations d'insecticides micro-encapsulés. Nombreuses sont celles qui sont utilisées pour les aspersions intra-domiciliaires, mais seules les concentrés émulsifiables, les suspensions concentrées et les concentrés d'insecticide micro-encapsulés peuvent être utilisés pour l'imprégnation des moustiquaires. Dans ce contexte, nous avons évalué une nouvelle formulation micro-encapsulée de DEET développée par Sumitomo corporation. Cette formulation « DEET MC » a été évaluée en test en tunnel (annexe 9) sur une population sensible aux insecticides de laboratoire d'*An. gambiae*, Kisumu. Dans cette étude comparative, nous avons utilisé comme témoin positif une formulation classique (Osler) destinée à l'application cutanée déjà employée pour l'imprégnation des moustiquaires de mélanges de PM+DEET exposées précédemment.

4.1 Evaluation d'une nouvelle formulation DEET sur tissu moustiquaire contre *An. gambiae*

Article 5 : N'Guessan R, Knols BJ, Pennetier C, Rowland MW. 2007. *Deet microencapsulation : a slow release formulation enhancing the residual efficacy of bednets against malaria vectors*. Trans Roy Soc trop Med Hyg. Sous presse.

Les tissus moustiquaires ont été imprégnés avec les deux formulations de DEET à 8 g/m². Ensuite un test en tunnel a été réalisé jusqu'à 6 mois après l'imprégnation. Cette étude a montré que des tulles moustiquaires imprégnés avec la formulation encapsulée de DEET MC repoussent, inhibent le gorgement et tuent les moustiques exposés pendant plus de 6 mois alors que la durée d'action de la formulation émulsifiable ne dépasse pas trois mois. Ces résultats sont encourageants, la technologie de micro encapsulation a permis d'augmenter la rémanence en laboratoire. Néanmoins comme nous l'avons vu précédemment, la rémanence des moustiquaires traitées avec des répulsifs seuls ou en mélanges diffère énormément entre le laboratoire et les conditions naturelles. L'étape suivante sera donc d'étudier la rémanence de cette formulation en cases expérimentales contre des populations naturelles d'*An. gambiae*.

Ces études concernant l'utilisation des répulsifs en imprégnations de matériaux sont pionnières et ouvrent différents axes de recherche extrêmement intéressants et prometteurs en terme de lutte contre les vecteurs. A l'heure actuelle, la technologie mettant en jeu les cyclodextrines est développée pour encapsuler le DEET à l'Université de Lille 1. Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques

dérivées de l'amidon avec une cavité intérieure dont le diamètre et le volume peuvent être adaptés pour incorporer des molécules organiques. Ce complexe supramoléculaire « hôte-invité » est réversible et la molécule répulsive « invitée » peut être libérée sans modifier ses propriétés chimiques. Pour finir, la technologie long-lasting permet actuellement la plus grande rémanence des insecticides sur les matériaux et plus particulièrement sur les moustiquaires. Il serait donc intéressant de développer cette technologie pour les répulsifs. Les mélanges insecticides non-pyréthrinoïdes / répulsifs pourraient ainsi constituer un véritable outil de substitution des pyréthrinoïdes au niveau opérationnel. Toutefois, avant d'envisager de telles utilisations, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes responsables de ces interactions synergistes tant pour étudier la toxicologie des mélanges que pour améliorer cette nouvelle stratégie.

5 DIETHYL-M-TOLUAMIDE OU DEET : ETUDE DE SON MODE D’ACTION SUR LE SYSTEME NERVEUX DE L’INSECTE

L'approche empirique utilisée jusqu'à présent a permis de mettre en évidence de forts effets synergiques entre OPs ou carbamates et répulsifs. Mais les mécanismes physiologiques responsables de ces interactions restent inconnus. Pourtant, mieux les comprendre pourrait contribuer à optimiser le choix des répulsifs à utiliser seul et/ou en association avec des insecticides sur moustiquaires. D'autant plus qu'un mélange de molécules actives à mode d'action différent doit être considéré comme un nouveau composé, et doit donc satisfaire aux exigences toxicologiques avant d'être utilisé en santé publique (Zaim *et al* 2000). Pour cela, il est nécessaire d'étudier les mécanismes physiologiques mis en jeu dans les phénomènes de synergie observés.

Cette troisième partie est donc une contribution à la recherche des mécanismes physiologiques impliqués dans la synergie entre les carbamates ou les OPs et le DEET.

Les carbamates et les OPs sont des inhibiteurs de l'AChE. Plus précisément, les organophosphorés créent une liaison biochimique en phosphorylant le site estérasique de l'enzyme, s'opposant à l'hydrolyse de l'acétylcholine. Dans un deuxième temps, une déalkylation va rendre irréversible cette phosphorylation entraînant le vieillissement de l'enzyme ce qui correspond à une inactivation définitive (Worek *et al* 2005; Costa 2006). Au contraire des organophosphorés, les carbamates inhibent l'acétylcholinestérase de façon réversible. En effet, après phosphorylation par un carbamate, l'acétylcholinestérase est capable de se réactiver spontanément plus ou moins rapidement selon la molécule.

En revanche à l'heure actuelle, seules des hypothèses sont émises pour le mode d'action du DEET (Debboun *et al* 2007) et des autres répulsifs. Précédemment nous avons vu que le DEET induisait une mortalité et un effet KD chez les moustiques lors d'un contact forcé. D'autres auteurs ont aussi rapporté une activité insecticide sur des insectes (Moss 1996; Xue *et al* 2003; Licciardi *et al* 2006). Ces résultats suggèrent une action neurotoxique. C'est pourquoi nous avons orienté nos recherches sur le système nerveux central (SNC) des insectes. Nous avons développé une approche multidisciplinaire visant à mieux comprendre les effets du DEET sur la transmission synaptique chez l'insecte et sur l'activité électrique de corps cellulaires de neurone d'insecte. Quatre équipes ont été impliquées dans cette étude : le laboratoire RCIM de l'Université d'Angers, UPRES EA 2647, le laboratoire LIN de l'Institut de Recherche pour le Développement à Montpellier, le laboratoire IPBS de l'Université Paul Sabatier de Toulouse et l' Institut de Biologie de l'Université N. Copernic de Torun en Pologne.

5.1 Etude de l'effet du DEET sur la transmission synaptique chez l'insecte

Article 6 : Corbel V, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D, Gautier H, Stojan J, Hougard J-M & Lapiède B. 2007. *DEET inhibit acetylcholinesterase activity in both insect and human nervous system.* En préparation.

Des bio-essais menés sur les trois modèles biologiques, *Ae. aegypti* et *Cx. quinquefasciatus* et *An. gambiae* ont permis de confirmer la neurotoxicité du DEET chez l'insecte (Pennetier *et al* 2005; Licciardi *et al* 2006; N'Guessan *et al* 2006; Pennetier *et al* 2007a) et les interactions synergiques entre propoxur et DEET suggèrent un effet important au niveau du SNC et notamment des synapses.

L'effet du DEET a été étudié sur la transmission synaptique des inter-neurones géants du nerf cerqual du 6^{ème} ganglion abdominal de la blatte, *Periplaneta americana*. La technique de l'oil-gap synaptique nous a permis de montrer que le DEET induisait un dérèglement de la transmission synaptique, i.e. une augmentation de l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) suivi d'une diminution. Cette diminution des PPSE peut être due à un mécanisme de régulation impliquant les récepteurs muscariniques (Corbel *et al* 2006). Lorsqu'on a prétraité avec de l'atropine, un bloqueur des récepteurs cholinergiques, le DEET a induit une accumulation d'acétylcholine dans la fente synaptique, ce qui suggère que l'acétylcholine n'est pas normalement hydrolysée en présence de DEET. Nous avons ensuite montré *in vitro* que le DEET inhibe l'hydrolyse de l'acétylcholine par les AChE de drosophile et de l'homme. De plus, le DEET inhibe la carbamoylation de l'AChE par le propoxur, ce qui indique que le DEET entre en compétition avec le carbamate au niveau du site actif. Ces résultats ont ainsi permis de modéliser l'entrée du DEET dans l'AChE et de montrer son positionnement à quelques Angstrom de la sérine impliquée dans le site catalytique.

Bien que l'activité anti-AchE puisse avoir une action négative sur la transmission du message nerveux, elle n'est pas obligatoirement la seule responsable de la neurotoxicité du DEET. Pour poursuivre, nous avons mis au point un protocole expérimental afin d'étudier l'effet du DEET sur le corps cellulaire de neurones pacemaker de la Blatte *P. americana*, les DUM neurones, qui constitue un modèle biologique très bien caractérisé (Grolleau & Lapiède 2000).

5.2 Etude l'effet du DEET sur le corps cellulaire d'un neurone pacemaker de *Periplaneta americana*

Article 7 : Pennetier C, Gautier H., Corbel V., Hougard J-M & Lapiède B. 2007. *The insect repellent DEET exerts neurotoxic effects through an elevation of intracellular calcium concentration in pacemaker insect neurosecretory cells .* En préparation

La technique du patch clamp nous a permis de montrer que le DEET (100µM) induisait une diminution de l'amplitude des potentiels d'action qui mène à l'arrêt de l'activité électrique du DUM neurone. Cette même expérience réalisée pour une faible dose de DEET (1µM) suggère l'implication du

calcium intracellulaire dans l'action du DEET sur l'activité électrique du neurone. Nous avons utilisé une technique d'imagerie calcique mettant en jeu une sonde fluorescente qui se lie au calcium. Cette technique nous a permis de suivre les variations de calcium suite à l'application de DEET dans le milieu extracellulaire. Sur les DUM neurones, les différentes sources de calcium sont bien caractérisées et nous avons à disposition des agents pharmacologiques capables d'inhiber spécifiquement chacun des canaux calciques. L'étude des variations du calcium intracellulaire induite par le DEET en présence de ces différents inhibiteurs nous a permis de montrer l'implication de différents canaux calciques et ainsi de proposer une cascade de réactions induisant une forte augmentation de la concentration en calcium intracellulaire à l'origine de la mort du neurone (Figure 4). Enfin, l'utilisation de bloqueurs des récepteurs cholinergiques (nicotiniques, muscariniques et mixtes) laisse suggérer que le DEET pourrait interagir avec les récepteurs cholinergiques à pharmacologie mixte. Deux étapes du schéma hypothétique du mode d'action du DEET sur les DUM neurones demandent à être vérifiés, notamment la fixation du DEET sur le récepteur cholinergique à pharmacologie mixte dont la structure moléculaire n'est pas encore décrite.

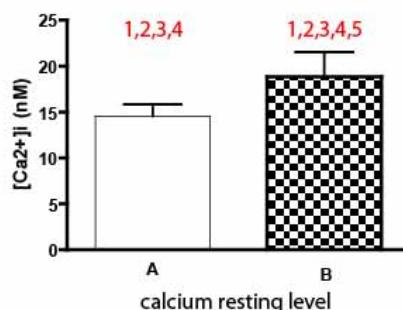
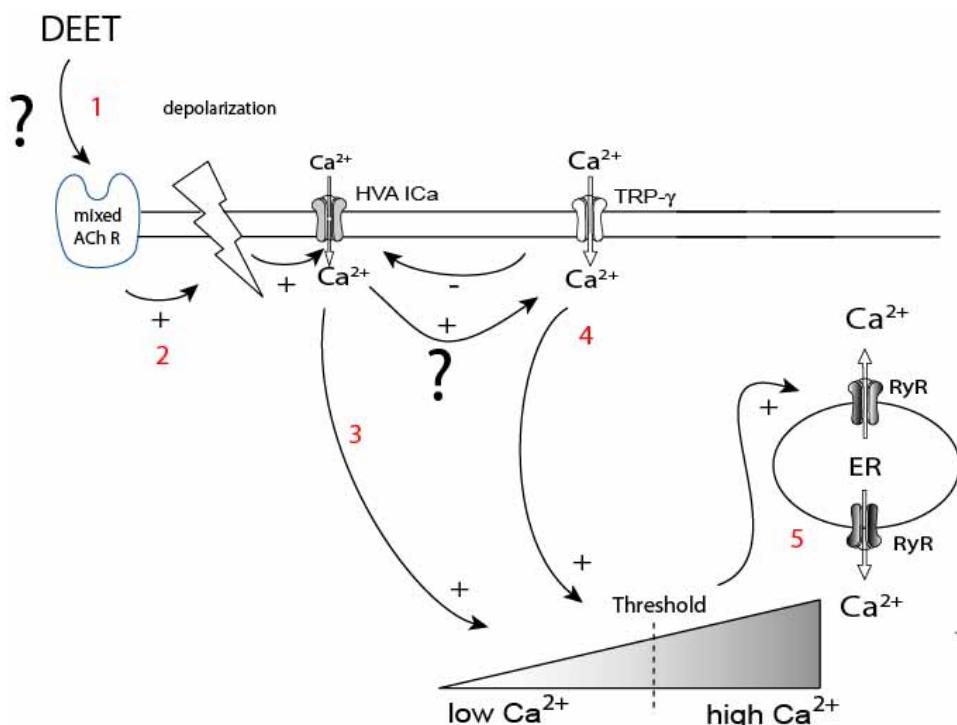


Figure 4 : Schéma hypothétique des variations de [Ca²⁺]_i d'un corps cellulaire de DUM neurone induite par l'application de DEET dans le milieu extracellulaire.

DEET : diethyl-m-toluamide ; mixed AChR : mixed acetylcholine receptor ; HVA ICa : high voltage activating calcium channel ; TRP-γ : transient receptor potential γ ; RyR : ryanodine receptor ; ER : endoplasmic reticulum.

Les récepteurs cholinergiques à pharmacologie mixte sensibles à l' α -bgtx sont des cibles potentielles du DEET (1). Ces récepteurs cholinergiques à pharmacologie mixte ont la capacité de dépolarisier la membrane (2). Les canaux calciques HVA sensibles à une dépoliarisation permettent une première entrée de calcium dans le cytoplasme (3). Les canaux calciques TRP-γ peuvent être activés par le calcium libéré par les HVA et permettent une seconde entrée de calcium dans le cytoplasme (4). En fonction de la concentration en calcium de base, la réponse induite par le DEET implique ou n'implique pas le CICR (Calcium Induced Calcium Release mechanism) (5). Ce qui suggère une notion de seuil de la [Ca²⁺]_i qu'il faut atteindre pour déclencher un effet neurotoxique conséquent du DEET impliquant le CICR.

En conclusion, nous avons montré que la neurotoxicité du DEET sur les insectes était due à plusieurs mécanismes. Nous avons identifié l'activité anti-AChE du DEET et mis en évidence une cascade d'évènements responsables de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ précédant la mort du neurone. Ces études encore préliminaires demandent à être poursuivies dans l'objectif d'identifier la ou les cibles moléculaires du DEET au niveau du corps cellulaire de neurone d'insecte.

Néanmoins la neurotoxicité du DEET, probablement nécessaire à son efficacité chez l'insecte, peut poser des problèmes toxicologiques pour les utilisateurs. En effet, nous avons montré que le DEET était un inhibiteur compétitif réversible de l'AChE d'insecte et d'humain avec des affinités comparables. Au vu des ces résultats, il apparaît indispensable de poursuivre les recherches sur les modes d'action des répulsifs et les mécanismes physiologiques impliqués dans la synergie avec les OPs et carbamates. La poursuite de ces recherches est d'autant plus importante que les quantités de répulsifs appliquées sur la peau par des millions d'utilisateurs chaque année sont beaucoup plus importantes que celles appliquées sur des supports comme les moustiquaires. Les risques toxicologiques sont donc accrus.

6 DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette étude des interactions entre insecticides non-pyréthrinoïdes et répulsifs s'inscrit dans le cadre général de la recherche de nouvelles stratégies de lutte contre les moustiques résistants aux pyréthrinoïdes. En effet, ces insecticides constituent actuellement le pivot de la lutte anti-vectorielle contre le paludisme car leurs propriétés permettent un contrôle efficace de la transmission lorsqu'ils sont utilisés sur des moustiquaires (Zaim *et al* 2000).

La recherche d'alternative aux pyréthrinoïdes est un axe de recherche majeur depuis quelques années car les résistances croisées à ces insecticides se développent rapidement et peuvent être un obstacle au bon déroulement des programmes nationaux de lutte contre le paludisme (Hemingway *et al* 2006). Comme nous l'avons développé en introduction, l'efficacité d'une moustiquaire imprégnée repose sur sa capacité à prévenir la piqûre de l'utilisateur et à tuer les moustiques vecteurs d'âge épidémiologiquement dangereux. La recherche d'alternatives a donc pour objectif de maintenir ou de reconstituer les propriétés de la moustiquaire imprégnée de pyréthrinoïde. De plus, les nouveaux outils proposés doivent nécessairement être des outils de gestion de la résistance. Ces objectifs opérationnels nous ont amené à conduire en parallèle des études en laboratoire et sur le terrain. Dans cette conclusion nous rappellerons et discuterons les principaux résultats obtenus avant de développer les perspectives ouvertes par ce travail.

6.1 Une nouvelle méthode de lutte contre les vecteurs

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les potentialités d'une utilisation combinée d'un insecticide non-pyréthrinoïde et d'un répulsif sur une moustiquaire imprégnée afin de lutter contre les vecteurs du paludisme résistants aux pyréthrinoïdes. Pour cela, nous avons d'abord étudié les interactions entre OPs ou carbamates et deux répulsifs, le DEET et le KBR 3023. Ensuite nous avons considéré les mélanges comme de nouveaux insecticides et nous les avons évalués en laboratoire et en conditions naturelles.

6.1.1 Synergie OPs ou carbamates / répulsifs

Les études de laboratoire et de terrain ont montré que le DEET interagissait positivement avec un carbamate, le propoxur et un organophosphoré, le pyrimiphos-méthyl (PM). Le KBR 3023 a également interagi positivement avec le PM. Ces interactions synergiques se traduisent par une efficacité supérieure à celle attendue sous l'hypothèse d'indépendance d'action de chacun des composés. En effet, nos études ont montré qu'il y avait un gain d'efficacité à mélanger un OP ou un carbamate à un des deux répulsifs, DEET et KBR 3023, en termes de mortalité induite, d'effet Knock Down (KD), de protection contre la piqûre et d'exophilie induite. Il faut noter que, pour la première fois, une synergie observée en laboratoire a été retrouvée sur le terrain. Ce sont ces interactions qui ont permis la mise au point d'une moustiquaire

efficace contre les moustiques résistants en l'imprégnant avec une faible dose d'insecticide non-pyréthrinoïde et d'une dose de répulsif.

6.1.2 Potentialités de ce nouvel outil

L'efficacité des mélanges carbamate ou OPs / répulsifs s'est avérée être comparable à celle de la deltaméthrine tant au laboratoire que sur le terrain, contre les populations de moustiques sensibles aux insecticides. L'effet KD résultant de la synergie entre deux composés non-pyréthrinoïdes est un résultat surprenant mais essentiel car il confère aux mélanges une rapidité d'action comparable aux pyréthrinoïdes.

Le deuxième résultat très important est l'efficacité des mélanges qui est maintenue contre des populations de moustiques résistants aux insecticides tant au laboratoire que sur le terrain. En conditions naturelles, les moustiquaires imprégnées des mélanges sont restées très efficaces contre des moustiques *An. gambiae* fortement résistants aux pyréthrinoïdes (gène *Kdr*) et aux OPs et/ou carbamates (gène *Ace.1^R*). Ce résultat est capital car contre la même population anophélien, l'efficacité d'une moustiquaire imprégnée d'une formulation standard de deltaméthrine a considérablement diminué (article 4). Les moustiquaires imprégnées des mélanges PM+DEET et PM+KBR peuvent donc constituer un outil de lutte très efficace même en zone de résistance aux pyréthrinoïdes mais aussi aux OPs et carbamates (lorsque la résistance est conférée par la mutation de cible *Kdr* pour les pyréthrinoïdes et *Ace.1^R* pour les OPs et carbamates).

6.1.3 Gestion de la résistance

Les moustiquaires imprégnées de mélanges OPs / répulsifs n'ont pas induit de mortalité supérieure parmi les moustiques sensibles que parmi les résistants aux OPs et pyréthrinoïdes. Ceci signifie qu'elles n'exercent pas de pression de sélection sur les gènes *Kdr* et *Ace.1^R* et donc qu'elles peuvent constituer en cela un bon outil de gestion de la résistance pour les deux gènes étudiés. Néanmoins, nous avons vu en introduction qu'il existait différents types de résistance notamment métabolique contre les OPs. En effet, des oxydases jouent un rôle dans la dégradation du DEET (Iley & Costantino 1993; Costantini *et al* 1998; Costantino & Iley 1999) et pourraient donc avoir une incidence (positive ou négative) sur l'efficacité sur les moustiquaires (Martin *et al* 2003). Il serait donc intéressant d'étudier l'efficacité de moustiquaires imprégnées de mélanges OPs ou carbamates / répulsifs contre des moustiques présentant ce type de résistance et leur impact sur l'évolution de cette résistance. Le réseau Anopheles Biology & Control (ABC) (Hougard & Simard 2005) au sein duquel ont été réalisées nos études de terrain offre la possibilité d'évaluer l'efficacité de cette stratégie contre une population anophélienne présentant une résistance aux pyréthrinoïdes de type métabolique (station expérimentale de Pitoa, Cameroun).

6.1.4 Autres applications possibles

Les mélanges d'insecticides OPs ou carbamates avec les répulsifs ont été étudiés dans l'objectif d'une application sur des moustiquaires pour lutter contre le paludisme. Mais cet outil pourrait s'appliquer sur différents matériaux toujours dans le cadre de la lutte contre les insectes vecteurs ou ravageurs et de la gestion de la résistance. Nous avons évalué l'efficacité de protection contre le vecteur de la dengue et de la fièvre jaune, *Ae. aegypti* de treillis de l'armée imprégnés d'un mélange de PM et de KBR 3023 en comparaison avec des treillis imprégnés de perméthrine (Deparis *et al* 2001; Deparis *et al* 2004). Les treillis imprégnés du mélange PM+KBR 3023 protègent de plus de 70% des piqûres contre seulement 55% pour celui imprégné de perméthrine, le pyréthrinoïde qui présente le plus fort effet excito-répulsif (Pennetier *et al.* résultats non publiés). Cette évaluation montre que le principe d'utiliser un mélange entre un OP et un répulsif sur des vêtements peut être prometteur comme stratégie de protection personnelle contre les vecteurs diurnes, pour lesquels les moustiquaires n'ont que peu ou pas d'effet.

Plus généralement, les mélanges OP/répulsif présentant une forte efficacité contre les insectes vecteurs porteurs des gènes de résistance (*Kdr* et *Ae. 1^R*) pourraient être évalués sur les différents supports utilisés contre différents insectes vecteurs ou ravageurs. Par exemple, une stratégie de protection des cultures maraîchères en milieu tropical a récemment été développée pour réduire le nombre de traitement foliaire. Il s'agit de couvrir les cultures la nuit avec un filet imprégné d'insecticide (Martin *et al* 2006). Ces filets imprégnés de pyréthrinoïdes sont actuellement utilisés pour protéger des cultures de choux (Licciardi *et al* 2007). La barrière physique permet de protéger des lépidoptères qui viennent pondre sur les feuilles. La barrière chimique permet d'intoxiquer les pucerons au passage des mailles du filet. Néanmoins, d'autres petits insectes, telle la mouche blanche *Bemisia tabaci*, sont résistants aux pyréthrinoïdes empêchant l'utilisation de cet outil sur d'autres cultures. Dans ce contexte, il pourrait être intéressant de tester l'efficacité de filets imprégnés de ces mélanges contre ces ravageurs.

6.1.5 Limites actuelles

Les recherches sur cette stratégie se heurtent actuellement à deux limites. La première vient du fait que les molécules répulsives utilisées sont volatiles et donc que le temps où elles restent bio-disponibles sur le support imprégné est limité. En effet, les mélanges testés sur le terrain se sont révélés efficaces pendant une dizaine de jours contre 4 mois en laboratoire. Nous avons montré que les industriels proposaient des formulations micro encapsulées qui permettent d'augmenter le temps d'efficacité sur la moustiquaire (Article 5). Ces formulations permettent un maintien du DEET bio-disponible jusqu'à 6 mois en laboratoire. Mais la différence de rémanence entre le test en tunnel (article 2) et l'évaluation en conditions naturelles (articles 3 et 4) est telle qu'une rémanence de 6 mois en laboratoire reste faible. Il convient donc de solliciter les compagnies industrielles concernées afin qu'une recherche soit initiée dans le but de proposer des formulations plus rémanentes et ainsi développer des technologies «à longue durée d'action» (type LNs) avec les mélanges OPs / répulsifs.

Une seconde limite vient du fait que l'on doit considérer les mélanges OPs ou carbamates / répulsifs comme des nouveaux composés. Ils doivent donc satisfaire les critères toxicologiques de l'OMS. Il est donc impératif d'évaluer la toxicité des mélanges sur les mammifères. En effet, 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, reflétaient une action sur le Système Nerveux Central (SNC) (Tenenbein 1987; Lipscomb *et al* 1992; Schaefer & Peters 1992; Verschoyle *et al* 1992; Schoenig *et al* 1993). Bien que le profil toxicologique du DEET soit favorable (Fradin 1998), certaines études ont mis en évidence une toxicité du DEET lorsqu'il est combiné avec d'autres substances actives (Moss 1996; Chaney *et al* 1997; Abdel-Rahman *et al* 2004a; Abdel-Rahman *et al* 2004b; Abou-Donia *et al* 2004). Par exemple, les interactions entre le Pyridostigmine bromide (un inhibiteur de l'acétylcholinestérase utilisé comme agent prophylactique d'exposition aux gaz organophosphorés) et le DEET soulèvent beaucoup d'interrogations depuis que plusieurs études ont suggéré l'implication de ces deux molécules dans les syndromes de la guerre du Golfe (Haley *et al* 1997b; Haley & Kurt 1997; Haley *et al* 1997a; McCain *et al* 1997; Chaney *et al* 2000). L'étude toxicologique de ces mélanges OPs / répulsif sera d'autant plus rapide et efficace si les mécanismes physiologiques responsables des interactions synergiques sont bien décrits. Ceci implique de bien connaître le mode d'action des différents répulsifs sur le système nerveux des insectes et d'étudier leur toxicologie lorsqu'ils sont utilisés seuls auparavant.

6.2 Les répulsifs en santé publique

6.2.1 Le mode d'action des répulsifs

L'étude menée sur le DEET nous a permis de mettre en évidence la complexité du mode d'action du DEET sur le SNC des insectes. Les deux principaux mécanismes mis en évidence sont l'activité anti-AChE du DEET (inhibiteur compétitif réversible) et l'augmentation importante de la concentration en calcium intracellulaire via l'activation de différents canaux calciques (Fig 5). Ces deux mécanismes participent à la neurotoxicité du DEET et probablement à la synergie avec les carbamates ou les OPs.

Les résultats concernant la toxicité du DEET induite par l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ sont préliminaires et ces études demandent à être poursuivies dans le but d'identifier la cible moléculaire du DEET qui déclenche cette cascade de réactions. Pour ce faire un protocole multidisciplinaire (patch-clamp, imagerie calcique, biochimie et biologie moléculaire) a été mis en place dans le cadre d'un projet ANR. Ce projet (ANR, program REACT n° 2006 SEST 030 01) plus large comporte un axe qui vise à déterminer les cascades d'événements neurophysiologiques et biochimiques impliquées par les répulsifs, molécules d'intérêt en santé publique.

En effet le mode d'action des autres répulsifs n'est pas connu. Contrairement au DEET, les autres répulsifs ne semblent pas avoir de propriétés neurotoxiques (Licciardi *et al* 2006) et semblent seulement

agir sur le système olfactif des insectes. Mais les neurones récepteurs olfactifs (ORNs) étant les premières unités du système sensoriel de l'insecte (Hallem & Carlson 2004), toute perturbation dans la transmission nerveuse pourrait affecter le comportement de l'insecte et ainsi perturber les processus impliqués dans la localisation de l'hôte. L'étude de l'effet des répulsifs sur les neurones d'insectes peut contribuer à comprendre les modifications comportementales induites par les répulsifs, de la fixation de la molécule répulsive ou attractive sur son récepteur cible au changement de comportement de l'insecte. Elles constituerait aussi une étape préliminaire indispensable à des études de toxicité sur l'homme.

6.2.2 Mécanismes physiologiques à l'origine des interactions synergiques

Les premiers résultats obtenus sur le mode d'action du DEET nous permettent d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes responsables des interactions synergiques avec les OPs et carbamates. En effet, bien qu'il y ait de nombreuses références concernant les interactions synergiques entre les insecticides, les mécanismes physiologiques sous-jacents à ces phénomènes restent méconnus. Ces mécanismes peuvent être de deux ordres :

- l'implication d'enzymes de détoxicification, où l'un des deux composés du mélange va interférer avec le processus de dégradation du second, augmentant ainsi la toxicité de l'association (Bodnaryk 1982; Corbett et al 1984; Martin et al 2003)
- perturbation physiologique générale impliquant les sites cibles des différentes molécules (Plapp 1979; Bodnaryk 1982)

Certains auteurs ont montré que la synergie observée en pyréthrinoïdes et OPs était causée par l'inhibition par les OPs des estérases (Gunning *et al* 1999) et des oxydases (Kulkarni & Hodgson 1980; Martin et al 2003), ce qui empêchait la dégradation des pyréthrinoïdes. Néanmoins, nombreux auteurs soulignent le fait que l'inhibition de l'activité des enzymes de dégradation par l'un ou l'autre des composés ne peut expliquer seule les interactions (synergiques ou antagonistes observées) observés dans leurs études (Bodnaryk 1982; Hemingway 1984; Horowitz *et al* 1987). Par exemple, Corbel *et al.* (2006) ont monté par des bio-essais réalisés sur *P. americana* en présence d'inhibiteurs de ces enzymes que la synergie entre la perméthrine (pyréthrinoïde) et le propoxur (carbamate) n'impliquait pas les enzymes de détoxicification (oxydases et estérases). En revanche ces auteurs ont montré que la synergie était due à une perturbation générale de la transmission synaptique. Plus précisément, l'inhibition de l'AChE par le propoxur et la dépolarisation du canal sodium par la perméthrine ont induit un excès d'acétylcholine dans la fente synaptique. L'acétylcholine en excès se fixe sur des récepteurs muscarinique qui activent un mécanisme de régulation (ou feedback négatif) qui stoppe la transmission nerveuse (Corbel *et al.* 2006).

L'activité anti-AChE du DEET et l'augmentation de calcium qu'il induit dans le neurone suggèrent que le DEET provoque une augmentation de la concentration d'acétylcholine dans la fente

synaptique. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet du mélange DEET-propoxur sur la synapse d'insecte afin de savoir si le mécanisme de feed-back négatif décrit par Corbel *et al.* (2006) est sollicité. La mise en évidence des mécanismes responsables de la synergie du DEET avec les OPs et les carbamates au niveau du système nerveux est une étape cruciale. Ces connaissances fondamentales seraient en effet très utiles pour l'étude des modifications du comportement des insectes par ce mélange ainsi que pour l'étude toxicologique.

6.2.3 Répulsifs et modifications du comportement de recherche de l'hôte

Nous avons vu que l'efficacité insecticide des mélanges PM+DEET et PM+KBR 3023 ne semble pas dépendre des modifications de l'exophilie et du taux de gorgement. A l'inverse, les modifications du comportement (exophilie et prise du repas sanguin) expliquaient une partie de la variabilité de l'efficacité insecticide des moustiquaires imprégnées de PM, de DEET ou de KBR 3023 seuls. Ceci souligne l'intérêt de bien étudier les modifications du comportement induites par toute molécule chimique destinée à la lutte contre les insectes vecteurs. En effet si l'anthropophilie, les caractères endophage ou exophage, endophile ou exophile sont bien caractérisés, le comportement d'approche de l'hôte dans l'habitation par l'anophèle vecteur reste flou. Dans la mesure où les molécules utilisées sur les moustiquaires peuvent modifier ce comportement, il apparaît important de comprendre plus finement le comportement de l'anophèle dans une case expérimentale où dort un homme sous une moustiquaire afin d'étudier les réponses comportementales en présence de différentes molécules sur la moustiquaire. Ces réponses peuvent être étudiées par des séances de captures bien que les différentes méthodes de piégeages ne permettent pas de contrôler toutes les variables comme la perturbation du comportement par la présence du piège (Costantini 1996). Dans ces conditions, l'utilisation de système vidéo pourrait être une solution pour étudier le comportement des anophèles face aux moustiquaires imprégnées de différentes molécules.

6.3 Conclusion générale

Ce travail constitue la première étape de l'étude d'une nouvelle stratégie de lutte contre les vecteurs du paludisme qui semble prometteuse. Une collaboration avec les industriels est maintenant nécessaire pour mettre en place une technologie qui permette d'exploiter pleinement toutes les potentialités des mélanges OPs / répulsifs. Plus généralement, notre approche a permis de souligner l'importance que prennent les répulsifs et les autres molécules volatiles (attractives notamment) dans la lutte contre les insectes vecteurs de maladies humaines.

Ce travail a soulevé des questions concernant le mode d'action des répulsifs, leur efficacité pour lutter contre un vecteur, leur rémanence sur des matériaux, les interactions avec d'autres molécules, les modifications comportementales qu'ils induisent et leurs toxicités seuls ou combinés. Ces questions sont autant de perspectives de recherche tant au niveau fondamental qu'appliqué, nécessitant une étroite collaboration entre chimistes, éthologues, physiologistes, biologistes moléculaires et entomologistes pour lutter plus efficacement contre les vecteurs de maladies humaines.

7 BIBLIOGRAPHIE

- ABDEL-RAHMAN, A., ABOU-DONIA, S., EL-MASRY, E., SHETTY, A., ABOU-DONIA, M. (2004a) Stress and combined exposure to low doses of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin produce neurochemical and neuropathological alterations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *J Toxicol Environ Health A* 67: 163-92
- ABDEL-RAHMAN, A., DECHKOVSKAIA, A. M., GOLDSTEIN, L. B., BULLMAN, S. H., KHAN, W., EL-MASRY, E. M., ABOU-DONIA, M. B. (2004b) Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. *J Toxicol Environ Health A* 67: 331-56
- ABOU-DONIA, M. B., DECHKOVSKAIA, A. M., GOLDSTEIN, L. B., ABDEL-RAHMAN, A., BULLMAN, S. L., KHAN, W. A. (2004) Co-exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and/or permethrin causes sensorimotor deficit and alterations in brain acetylcholinesterase activity. *Pharmacol Biochem Behav* 77: 253-62
- AGNEW, P., BERTICAT, C., BEDHOMME, S., SIDOBRE, C., MICHALAKIS, Y. (2004) Parasitism increases and decreases the costs of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution Int J Org Evolution* 58: 579-86
- ALOUT, H., BERTHOMIEU, A., HADJIVASSILIS, A., WEILL, M. (2007) A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to *Culex pipiens* mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 41-7
- ASIDI, A. N., N'GUÉSSAN, R., KOFFI, A. A., CURTIS, C. F., HOUGARD, J. M., CHANDRE, F., CORBEL, V., DARRIET, F., ZAIM, M., ROWLAND, M. W. (2005) Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J* 4: 25
- BADOLLO, A. (2004) Evaluation de l'efficacité de trois répulsifs DEET, IR3535 et KBR 3023 dans la protection contre les vecteurs du paludisme, de la dengue et de la fièvre jaune au Burkina Faso. Université de Ouagadougou, Ouagadougou
- BADOLLO, A., ILBOUDO-SANOGO, E., OUEDRAOGO, A. P., COSTANTINI, C. (2004) Evaluation of the sensitivity of *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023. *Trop Med Int Health* 9: 330-4
- BARNARD, D. R. (2005) Biological assay methods for mosquito repellents. *J Am Mosq Control Assoc* 21: 12-6
- BARNARD, D. R., BERNIER, U. R., XUE, R. D., DEBBOUN, M. (2007) Standard Methods for Testing Mosquito Repellents. In: Debboun, M., Frances, S. P., Strickman, D. (eds) INSECT REPELLENTS : principles, Methods, and uses. CRC Press, Taylor & Francis Group, pp 103-110
- BAYOH, M. N., THOMAS, C. J., LINDSAY, S. W. (2001) Mapping distributions of chromosomal forms of *Anopheles gambiae* in West Africa using climate data. *Med Vet Entomol* 15: 267-74
- BEH. (2006) Comment se protéger des piqûres de moustiquesvecteurs de Chikungunya. Direction Générale de la santé N° hors série: <http://www.invs.sante.fr/beh/2006/>
- BERTICAT, C., BOQUIEN, G., RAYMOND, M., CHEVILLON, C. (2002) Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res* 79: 41-7
- BLOOMQUIST, J. R. (1996) Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol* 41: 163-90

- BODNARYK, R. (1982) The effect of single and combined doses of chlordimeform and permethrin on cAMP and cGMP levels in the moth. *Pestic Biochem Physiol* 18: 334-40.
- BOURGUET, D., ROIG, A., TOUTANT, J. P., ARPAGAUS, M. (1997a) Analysis of molecular forms and pharmacological properties of acetylcholinesterase in several mosquito species. *Neurochem Int* 31: 65-72
- BOURGUET, D., LENORMAND, T., GUILLEMAUD, T., MARCEL, V., FOURNIER, D., RAYMOND, M. (1997b) Variation of dominance of newly arisen adaptive genes. *Genetics* 147: 1225-34
- BREMAN, J. G. (2001) The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg* 64: 1-11
- BREMAN, J. G., EGAN, A., KEUSCH, G. T. (2001) The intolerable burden of malaria: a new look at the numbers. *Am J Trop Med Hyg* 64: iv-vii
- BRENGUES, C., HAWKES, N. J., CHANDRE, F., MCCARROLL, L., DUCHON, S., GUILLET, P., MANGUIN, S., MORGAN, J. C., HEMINGWAY, J. (2003) Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17: 87-94
- CHANDRE, F., DARRIET, F., DARDER, M., CUANY, A., DOANNIO, J. M. C., PASTEUR, N., GUILLET, P. (1998) Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 359-366
- CHANDRE, F., DARRIET, F., DUCHON, S., FINOT, L., MANGUIN, S., CARNEVALE, P., GUILLET, P. (2000) Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology* 14: 81-88
- CHANDRE, F., MANGUIN, S., BRENGUES, C., DOSSOU YOVO, J., DARRIET, F., DIABATE, A., CARNEVALE, P., GUILLET, P. (1999) Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia* 41: 319-22
- CHANAY, L. A., WINEMAN, R. W., ROCKHOLD, R. W., HUME, A. S. (2000) Acute effects of an insect repellent, N,N-diethyl-m-toluamide, on cholinesterase inhibition induced by pyridostigmine bromide in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 165: 107-14
- CHANAY, L. A., ROCKHOLD, R. W., MOZINGO, J. R., HUME, A. S., MOSS, J. I. (1997) Potentiation of pyridostigmine bromide toxicity in mice by selected adrenergic agents and caffeine. *Vet Hum Toxicol* 39: 214-9
- CLAYTON, J. (2006) Scientists plan field tests for GM mosquitoes. *Lancet Infect Dis* 6: 191-2
- COLLINS, F. H., PASKEWITZ, S. M. (1995) Malaria: current and future prospects for control. *Annu Rev Entomol* 40: 195-219
- COLUZZI, M., PETRARCA, V., DI DECO, M. A. (1985) Chromosomal inversion intergradation and incipient speciation in *Anopheles gambiae*. *Bullettino di Zoologia* 52: 45-63
- COLUZZI, M., SABATINI, A., PETRARCA, V., DI DECO, M. A. (1979) Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73: 483-97

COMINS, H. N. (1986) Tactics for resistance management using multiple pesticides. *Agric. Ecosyst. and Environ* 16: 129-148

CORBEL, V., DARRIET, F., CHANDRE, F., HOUGARD, J. M. (2002) Insecticide mixtures for mosquito net impregnation against malaria vectors. *Parasite* 9: 255-9

CORBEL, V., CHANDRE, F., DARRIET, F., LARDEUX, F., HOUGARD, J. M. (2003) Synergism between permethrin and propoxur against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Med Vet Entomol* 17: 158-64

CORBEL, V., RAYMOND, M., CHANDRE, F., DARRIET, F., HOUGARD, J. M. (2004a) Efficacy of insecticide mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) resistant to pyrethroids and carbamates. *Pest Manag Sci* 60: 375-80

CORBEL, V., STANKIEWICZ, M., BONNET, J., GROLLEAU, F., HOUGARD, J. M., 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*: 1-12.

CORBEL, V., CHANDRE, F., BRENGUES, C., AKOGBETO, M., LARDEUX, F., HOUGARD, J. M., GUILLET, P. (2004b) Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malar J* 3: 22

CORBEL, V., N'GUESSAN, R., BRENGUES, C., CHANDRE, F., DJOGBENOU, L., MARTIN, T., AKOGBETO, M., HOUGARD, J. M., ROWLAND, M. (2007) Multiple insecticide resistance mechanisms in *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* from Benin, West Africa. *Acta Trop* 101: 207-16

CORBETT, J. R., WRIGHT, K., BAILLIE, A. C. (1984) The biomedical mode of action of pesticides. 2nd ed Academic Press, London, pp 1-382

COSTA, L. G. (2006) Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta* 366: 1-13

COSTANTINI, C. (1996) Behavioural studies on west african malaria vectors in the field. Imperial College of Science, Technology and Medicine, London

COSTANTINI, C., BADOLLO, A., ILBOUDO-SANOGO, E. (2004) Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afrotropical vector mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 644-52

COSTANTINI, C., SAGNON, N. F., DELLA TORRE, A., DIALLO, M., BRADY, J., GIBSON, G., COLUZZI, M. (1998) Odor-mediated host preferences of West African mosquitoes, with particular reference to malaria vectors. *Am J Trop Med Hyg* 58: 56-63

COSTANTINO, L., ILEY, J. (1999) Microsomal metabolism of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET, DET): the extended network of metabolites. *Xenobiotica* 29: 409-416

CUAMBA, N., CHOI, K. S., TOWNSON, H. (2006) Malaria vectors in Angola: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex, their pyrethroid insecticide knockdown resistance (kdr) status and *Plasmodium falciparum* sporozoite rates. *Malar J* 5: 2

CURTIS, C. (1985) Theoretical methods of the use of insecticide mixtures for management of resistance. *Bull. Entomol. Res.* 75: 259-265

CURTIS, C. F., MNZAVA, A. E. (2000) Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control. Bull World Health Organ 78: 1389-400

DARRIET, F., CORBEL, V., HOUGARD, J. M. (2003) Efficacy of mosquito nets treated with a pyrethroid-organophosphorous mixture against Kdr- and Kdr+ malaria vectors (*Anopheles gambiae*). Parasite 10: 359-62

DARRIET, F., HOUGARD, J. M., CORBEL, V. (2005) [Effect of pyrethroid and organophosphate bi-treated nets on the behaviour of Kdr+ *Anopheles gambiae* mosquitoes]. Bull Soc Pathol Exot 98: 201-4

DARRIET, F., THO VIEN, N., ROBERT, V., CARNEVALE, P. (1984) In: Evaluation of the efficacy of permethrin impregnated intact and perforated mosquito nets against vectors of malaria. WHO, p 20

DARRIET, F., N'GUESSAN, R., HOUGARD, J. M., TRAORE-LAMIZANA, M., CARNEVALE, P. (2002) [An experimental tool essential for the evaluation of insecticides: the testing huts]. Bull Soc Pathol Exot 95: 299-303

DARRIET, F., GUILLET, P., N'GUESSAN, R., DOANNIO, J. M., KOFFI, A., KONAN, L. Y., CARNEVALE, P. (1998) [Impact of resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets]. Med Trop (Mars) 58: 349-54

DARRIET, F., N'GUESSAN, R., KOFFI, A. A., KONAN, L., DOANNIO, J. M., CHANDRE, F., CARNEVALE, P. (2000) [Impact of pyrethrin resistance on the efficacy of impregnated mosquito nets in the prevention of malaria: results of tests in experimental cases with deltamethrin SC]. Bull Soc Pathol Exot 93: 131-4

DAVID, J. P., STRODE, C., VONTAS, J., NIKOU, D., VAUGHAN, A., PIGNATELLI, P. M., LOUIS, C., HEMINGWAY, J., RANSON, H. (2005) The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 4080-4

DAVIS, E. E. (1985) Insect repellents: concepts of their mode of action relative to potential sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae). J Med Entomol 22: 237-43

DEBBOUN, M., FRANCES, S. P., STRICKMAN, D. (2007) INSECT REPELLENTS : principles, Methods, and uses. CRC Press, Taylor & Francis Group

DELLA TORRE, A., FANELLO, C., AKOGBETO, M., DOSSOU-YOVO, J., FAVIA, G., PETRARCA, V., COLUZZI, M. (2001) Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. Insect Mol Biol 10: 9-18

DEPARIS, X., BOUTIN, J. P., MICHEL, R., GALOISY-GUIBAL, L., MEYNARD, J. B., PAGES, F., MATTON, T., SPIEGEL, A., BAUDON, D. (2001) [Disease vector control strategy in the French army]. Med Trop (Mars) 61: 87-90

DEPARIS, X., FRERE, B., LAMIZANA, M., N'GUESSAN, R., LEROUX, F., LEFEVRE, P., FINOT, L., HOUGARD, J. M., CARNEVALE, P., GILLET, P., BAUDON, D. (2004) Efficacy of permethrin-treated uniforms in combination with DEET topical repellent for protection of French military troops in Cote d'Ivoire. J Med Entomol 41: 914-21

DIABATE, A., BALDET, T., CHANDRE, C., DABIRE, K. R., KENGNE, P., GUIQUEMDE, T. R., SIMARD, F., GUILLET, P., HEMINGWAY, J., HOUGARD, J. M. (2003) KDR mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. J Med Entomol 40: 195-8

- DIABATE, A., BALDET, T., CHANDRE, F., AKOOBETO, M., GUIQUEMDE, T. R., DARRIET, F., BRENGUES, C., GUILLET, P., HEMINGWAY, J., SMALL, G. J., HOUGARD, J. M. (2002) The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* s.l. in Burkina Faso. Am J Trop Med Hyg 67: 617-22
- DIABATE, A., BRENGUES, C., BALDET, T., DABIRE, K. R., HOUGARD, J. M., AKOGBETO, M., KENGNE, P., SIMARD, F., GUILLET, P., HEMINGWAY, J., CHANDRE, F. (2004) The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. Trop Med Int Health 9: 1267-73
- DIATTA, M., SPIEGEL, A., LOCHOUARN, L., FONTENILLE, D. (1998) Similar feeding preferences of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis* in Senegal. Trans R Soc Trop Med Hyg 92: 270-2
- DOGAN, E. B., AYRES, J. W., ROSSIGNOL, P. A. (1999) Behavioural mode of action of deet: inhibition of lactic acid attraction. Med Vet Entomol 13: 97-100
- DUCHEMIN, J. B., TSY, J. M., RABARISON, P., ROUX, J., COLUZZI, M., COSTANTINI, C. (2001) Zoophily of *Anopheles arabiensis* and *An. gambiae* in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. Med Vet Entomol 15: 50-7
- FANELLO, C., CARNEIRO, I., ILBOUDO-SANOGO, E., CUZIN-OUATTARA, N., BADOLO, A., CURTIS, C. F. (2003) Comparative evaluation of carbosulfan- and permethrin-impregnated curtains for preventing house-entry by the malaria vector *Anopheles gambiae* in Burkina Faso. Med Vet Entomol 17: 333-8
- FAVIA, G., TORRE, A. D., BAGAYOKO, M., LANFRANCOTTI, A., SAGNON N, F., TOURE, Y. T., COLUZZI, M., DELLA TORRE, A. (1997) Molecular identification of sympatric chromosomal forms of *Anopheles gambiae* and further evidence of their reproductive isolation. Insect Molecular Biology 6: 377-383
- FEGAN, G. W., NOOR, A. M., AKHWALE, W. S., COUSENS, S., SNOW, R. W. (2007) Effect of expanded insecticide-treated bednet coverage on child survival in rural Kenya: a longitudinal study. Lancet 370: 1035-9
- FOURNIER, D. (2005) Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. Chem Biol Interact
- FOURNIER, D., MUTERO, A. (1994) Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. Comp Biochem Physiol 108C: 19-31
- FOURNIER, D., CUANY, A., BRIDE, J. M., BERGE, J. B. (1987) Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica* L.). J Neurochem 49: 1455-61
- FOURNIER, D., BRIDE, J. M., HOFFMANN, F., KARCH, F. (1992) Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. J Biol Chem 267: 14270-4
- FRADIN, M. S. (1998) Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. Ann Intern Med 128: 931-40
- GEORGHIOU, G. P. (1980) Insecticide resistance and prospects for its management. Residue review 76: 131-144
- GEORGHIOU, G. P., TAYLOR, C. E. (1977) Proceedings 15th Intern. Congress Entomology. Entomological Soc. Am., College Park, Maryland, pp 759-785

- GILLIES, M. T., COETZEE, M. C. (1987) Anophelines mosquitoes: A supplement to the Anopheninae of Africa South of the Sahara (Afrotropical region). Publication of the South African Institute for Medical Research
- GOUCK, H. K., MOUSSA, M. A. (1969) Field Tests with bed nets treated with repellents to prevent mosquito bites. Mosquito News 29: 263-264
- GOUCK, H. K., GODWIN, D. R., SCHRECK, C. E., SMITH, N. (1967) Field tests with repellent-treated netting against black salt-marsh mosquitoes. J Econ Entomol 60: 1451-2
- GRATZ, N. G. (1999) Emerging and resurging vector-borne diseases. Annu Rev Entomol 44: 51-75
- GREENWOOD, B. M., BOJANG, K., WHITTY, C. J., TARGETT, G. A. (2005) Malaria. Lancet 365: 1487-98
- GUBLER, D. J. (2004) The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? Comp Immunol Microbiol Infect Dis 27: 319-30
- GUILLER, P., ALNWICK, D., CHAM, M. K., NEIRA, M., ZAIM, M., HEYMANN, D., MUKELABAI, K. (2001) Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention. Bull World Health Organ 79: 998
- GUNNING, R. V., MOORES, G. D., DEVONSHIRE, A. L. (1999) Esterase inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Pesticide Biochemistry and Physiology 63: 50-62
- HALEY, R. W., KURT, T. L. (1997) Self-reported exposure to neurotoxic chemical combinations in the Gulf War. A cross-sectional epidemiologic study. Jama 277: 231-7
- HALEY, R. W., KURT, T. L., HOM, J. (1997a) Is there a Gulf War Syndrome? Searching for syndromes by factor analysis of symptoms. Jama 277: 215-22
- HALEY, R. W., HOM, J., ROLAND, P. S., BRYAN, W. W., VAN NESS, P. C., BONTE, F. J., DEVOUS, M. D., SR., MATHEWS, D., FLECKENSTEIN, J. L., WIANS, F. H., JR., WOLFE, G. I., KURT, T. L. (1997b) Evaluation of neurologic function in Gulf War veterans. A blinded case-control study. Jama 277: 223-30
- HALLEM, E. A., CARLSON, J. R. (2004) The odor coding system of *Drosophila*. Trends Genet 20: 453-9
- HARGREAVES, K., KOEKEMOER, L. L., BROOKE, B. D., HUNT, R. H., MTHEMBU, J., COETZEE, M. (2000) Anopheles funestus resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. Medical and Veterinary Entomology 14: 181-189
- HAY, S. I., GUERRA, C. A., TATEM, A. J., NOOR, A. M., SNOW, R. W. (2004) The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. Lancet Infect Dis 4: 327-36
- HAY, S. I., GUERRA, C. A., TATEM, A. J., ATKINSON, P. M., SNOW, R. W. (2005a) Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. Nat Rev Microbiol 3: 81-90
- HAY, S. I., SHANKS, G. D., STERN, D. I., SNOW, R. W., RANDOLPH, S. E., ROGERS, D. J. (2005b) Climate variability and malaria epidemics in the highlands of East Africa. Trends Parasitol 21: 52-3
- HEMINGWAY, J. (1984) The joint action of malathion and IBP against malathion-resistant and -susceptible strains of *Anopheles stephensi*. Bull World Health Organ 62: 445-9

- HEMINGWAY, J., BODDINGTON, R. G., HARRIS, J., DUNBAR, S. J. (1989) Mechanisms of insecticide resistance in *Aedes aegypti* (L.) (Diptera : Culicidae) from Puerto Rico. Bull Entomol Res 79: 123-130
- HEMINGWAY, J., HAWKES, N. J., MCCARROLL, L., RANSON, H. (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. Insect Biochem Mol Biol 34: 653-65
- HEMINGWAY, J., BEATY, B. J., ROWLAND, M., SCOTT, T. W., SHARP, B. L. (2006) The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. Trends Parasitol 22: 308-12
- HENRY, M. C., ASSI, S. B., ROGIER, C., DOSSOU-YOVO, J., CHANDRE, F., GUILLET, P., CARNEVALE, P. (2005) Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in *Anopheles gambiae* pyrethroid resistance areas of Côte d'Ivoire. Am J Trop Med Hyg 73: 859-64
- HOROWITZ, A., TOSCANO, N. C., YOUNGMAN, R. R., MILLER, T. A. (1987) Synergistic activity of binary mixtures of insecticides on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) Eggs. J Eco Entomol 80: 333-37
- HOUGARD, J. M., SIMARD, F. (2005) The ABC Network: Anopheles Biology and Control. Journal of the Cameroon Academy of Sciences 5: 85-87
- HOUGARD, J. M., POUDIOUGO, P., GUILLET, P., BACK, C., AKPOBOUA, L. K. B., QUILÉVÉRÉ, D. (1993) Criteria for the selection of larvicides by the onchocerciasis control programme in West Africa. Ann Trop Med Parasitol 85: 435-442
- HOUGARD, J. M., CORBEL, V., N'GUESSAN, R., DARRIET, F., CHANDRE, F., AKOGBETO, M., BALDET, T., GUILLET, P., CARNEVALE, P., TRAORE-LAMIZANA, M. (2003) Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Côte d'Ivoire. Bull Entomol Res 93: 491-8
- ILEY, J., COSTANTINO, L. (1993) The microsomal dealkylation of N,N-dialkylbezamides. Biochem Pharmacol 47: 275-280
- IRAC. (2006) In: Prevention and management of insecticide resistance in vectors and pests of public health importance. Insecticide Resistance Action Committee, pp 7-13
- KETTLE, D. S. (1995) Medical and veterinary entomology. CAB International, Wallington, U.K.
- KISZEWSKI, A., MELLINGER, A., SPIELMAN, A., MALANEY, P., SACHS, S. E., SACHS, J. (2004) A global index representing the stability of malaria transmission. Am J Trop Med Hyg 70: 486-98
- KOLACZINSKI, J. H., FANELLO, C., HERVE, J. P., CONWAY, D. J., CARNEVALE, P., CURTIS, C. F. (2000) Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance. Bull Entomol Res 90: 125-32
- KOLACZINSKI, K., KOLACZINSKI, J., KILIAN, A., MEEK, S. (2007) Extension of indoor residual spraying for malaria control into high transmission settings in Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg 101: 852-3
- KULKARNI, A. P., HODGSON, E. (1980) Metabolism of insecticides by mixed function oxydase systems. . Pharmacol Ther 8: 379-475
- KURTAK, D. C. (1990) Maintenance of effective control of *Simulium damnosum* in the face of insecticide resistance. Acta Leiden 59: 95-112

LEEPER, J. R., ROUSH, R. T., REYNOLDS, H. T. (1986) Preventing or managing resistance in arthropods. In: populations, C. o. s. f. t. m. o. p. r. p. (ed.) Pesticide Resistance, Strategies and Tactics for Management populations. National Academmy Press, Washington, D.C., pp 335-346

LENGELE, C. (2004) Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. Cochrane Database Syst Rev: CD000363

LICCIARDI, S., HERVE, J. P., DARRIET, F., HOUGARD, J. M., CORBEL, V. (2006) Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays. Med Vet Entomol 20: 288-93

LICCIARDI, S., ASSOGBA-KOMLAN, F., SIDICK, I., CHANDRE, F., HOUGARD, J. M., MARTIN, T. (2007) A temporary tunnel screen as an eco-friendly method for small-scale growers to protect cabbage crop in Benin. . International Journal of Tropical Insect Science: submited

LINES, J. (1996) Review: mosquito nets and insecticides for net treatment: a discussion of existing and potential distribution systems in Africa. Trop Med Int Health 1: 616-32

LIPSCOMB, J. W., KRAMER, J. E., LEIKIN, J. B. (1992) Seizure following brief exposure to the insect repellent N,N-diethyl-m-toluamide. Ann Emerg Med 21: 315-7

LOUIS, J. P., ALBERT, J. P. (1988) [Malaria in the Republic of Djibouti. Strategy for control using a biological antilarval campaign: indigenous larvivorous fishes (*Aphanius dispar*) and bacterial toxins]. Med Trop (Mars) 48: 127-31

LUNDWALL, E., PENNETIER, C., CORBEL, V., DE GENTILE, L., LEGROS, F. (2005) [Malaria: what about exposure prophylaxis?]. Rev Prat 55: 841-8

MARBIAH, N. T., PETERSEN, E., DAVID, K., MAGBITY, E., LINES, J., BRADLEY, D. J. (1998) A controlled trial of lambda-cyhalothrin-impregnated bed nets and/or dapsone/pyrimethamine for malaria control in Sierra Leone. Am J Trop Med Hyg 58: 1-6

MARTIN, T., OCHOU, O. G., VAISSAYRE, M., FOURNIER, D. (2003) Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. Insect Biochem Mol Biol 33: 883-7

MARTIN, T., OCHOU, G. O., HALA-NKLO, F., VASSAL, J. M., VAYSSAIRE, M. (2000) Pyrethroid resistance in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, in West Africa. Pest Manag Sci 56: 546-554

MARTIN, T., ASSOGBA-KOMLAN, F., HOUNDETE, T., HOUGARD, J. M., CHANDRE, F. (2006) Efficacy of mosquito netting for sustainable small holders' cabbage production in Africa. J Econ Entomol 99: 450-4

MARTINEZ TORRES, D., CHANDRE, F., WILLIAMSON, M. S., DARRIET, F., BERGE, J. B., DEVONSHIRE, A. L., GUILLET, P., PASTEUR, N., PAURON, D. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect Molecular Biology 7: 179-184

MCCABE, E. T., BARTHEL, W. F., GERTLER, S. I., HALL, S. A. (1954) Insect repellents, III, N, N-diethylamides. J Org Chem 19: 493

MCCAIN, W. C., LEE, R., JOHNSON, M. S., WHALEY, J. E., FERGUSON, J. W., BEALL, P., LEACH, G. (1997) Acute oral toxicity study of pyridostigmine bromide, permethrin, and DEET in the laboratory rat. J Toxicol Environ Health 50: 113-24

- MCIVER, S. B. (1981) A model for the mechanism of action of the repellent DEET on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 18: 357-61
- MILLER, J. E., LINDSAY, S. W., ARMSTRONG, J. R. (1991) Experimental hut trials of bednets impregnated with synthetic pyrethroid or organophosphate insecticide for mosquito control in The Gambia. *Med Vet Entomol* 5: 465-76
- MOSS, J. I. (1996) Synergism of toxicity of N,N Diethyl m toluamide to German Cockroaches (Orthoptera: Blattellidae) by Hydrolytic Enzyme Inhibitors. *Journal of Economical Entomology* 89: 1151-1155
- MOUCHES, C., MAGNIN, M., BERGE, J. B., DE SILVESTRI, M., BEYSSAT, V., PASTEUR, N., GEORGHIOU, G. P. (1987) Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2113-6
- MOUCHET, J., CARNEVALE, P., COOSEMANS, M., JULVEZ, J., MANGUIN, S., RICHARD-ENOBLE, D., SIRCOULON, J. (2004) *Biodiversité du paludisme dans le monde*. John Libbey Eurotext
- MULLEN, G., DURDEN, L. (2002) *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press
- MUTERO, A., PRALAVORIO, M., BRIDE, J. M., FOURNIER, D. (1994) Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5922-6
- N'GUÉSSAN, R., CORBEL, V., AKOGBETO, M., ROWLAND, M. (2007) Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerging Infectious Diseases* 13: 199-206.
- N'GUÉSSAN, R., ROWLAND, M., TRAORE LAMIZANA, M., KESSE, N. B., CARNEVALE, P. (2006) Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Trop Med Int Health* in press
- N'GUÉSSAN, R., DARRIET, F., GUILLET, P., CARNEVALE, P., TRAORE-LAMIZANA, M., CORBEL, V., KOFFI, A. A., CHANDRE, F. (2003) Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol* 17: 19-25
- NARAHASHI, T. (2000) Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: past, present, and future. *J Pharmacol Exp Ther* 294: 1-26
- NAUEN, R. (2006) Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest Management Sciences* 62: 690-692
- NENTWIG, G. (2003) Use of repellents as prophylactic agents. *Parasitol Res* 90 Supp 1: S40-8
- OMUMBO, J. A., HAY, S. I., GUERRA, C. A., SNOW, R. W. (2004) The relationship between the *Plasmodium falciparum* parasite ratio in childhood and climate estimates of malaria transmission in Kenya. *Malar J* 3: 17
- OMUMBO, J. A., GUERRA, C. A., HAY, S. I., SNOW, R. W. (2005) The influence of urbanisation on measures of *Plasmodium falciparum* infection prevalence in East Africa. *Acta Trop* 93: 11-21
- OPPENOORTH, F. J. (1985) Biochemistry and Physiology of Resistance. In: Gilbert, G. K. a. L. (ed.) *Comprehensive Insect Physiology. Biochem. Pharmacol.*, pp 731-773
- OVERGAARD, H. J., ANGSTREICH, M. G. (2007) WHO promotes DDT? *Lancet Infect Dis* 7: 632-3

PAURON, D., BARHANIN, J., AMICHOT, M., PRALAVORIO, M., BERGÉ, J. B., LAZDUNSKI, M. (1989) Pyrethroid receptor in insect Na⁺ channel: alteration of its properties in pyrethroid-resistant flies. Biochemistry 28: 1673-1677

PELHATE, M. (1985) L'axone géant de blatte, électrophysiologie-pharmacologie. Application à l'étude du mode d'action d'insecticides Mode d'action et utilisation des insecticides : Insectes, insecticides, santé. Publication A., Paris, pp 185-189

PENNETIER, C., CORBEL, V., 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: 739-44

PENNETIER, C., CORBEL, V., BOKO, P., ODJO, A., N'GUESSAN, R., LAPIED, B., HOUGARD, J. M. (2007a) Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. Malar J 6: 38

PENNETIER, C., COSTANTINI, C., CORBEL, V., LICCIARDI, S., DABIRE, K. R., LAPIED, B., CHANDRE, F., HOUGARD, J. M. (2007b) A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than pyrethroid against multi-locus resistant *Anopheles gambiae*. submitted

PETRARCA, V., PETRANGELI, G., ROSSI, P., SABATINELLI, G. (1986) [Chromosomal study of *Anopheles gambiae* and *Anopheles arabiensis* in Ouagadougou (Burkina Faso) and various neighboring villages]. Parassitologia 28: 41-61

PINTO, J., LYND, A., ELISSA, N., DONNELLY, M. J., COSTA, C., GENTILE, G., CACCONE, A., DO ROSARIO, V. E. (2006) Co-occurrence of East and West African kdr mutations suggests high levels of resistance to pyrethroid insecticides in *Anopheles gambiae* from Libreville, Gabon. Med Vet Entomol 20: 27-32

PITMAN, R. M. (1971) Transmitter substances in insects: a review. Comp Gen Pharmacol 2: 347-71

PLAPP, F. W. (1979) Synergism of pyrethroid insecticides by formamidines against *Heliothis* pest of cotton. J Econ Entomol 72: 667-670

RANSON, H., JENSEN, B., VULULE, J. M., WANG, X., HEMINGWAY, J., COLLINS, F. H. (2000) Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. Insect Molecular Biology 9: 491-497

RAYMOND-DELPECH, V., MATSUDA, K., SATTELLE, B. M., RAUH, J. J., SATTELLE, D. B. (2005) Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. Invert Neurosci 5: 119-33

REIMER, L. J., TRIPET, F., SLOTMAN, M., SPIELMAN, A., FONDJO, E., LANZARO, G. C. (2005) An unusual distribution of the kdr gene among populations of *Anopheles gambiae* on the island of Bioko, Equatorial Guinea. Insect Mol Biol 14: 683-8

REITERA, P., THOMAS, C. J., ATKINSON, P. M., HAY, S. I., RANDOLPH, S. E., ROGERS, D. J., SHANKS, G. D., SNOW, R. W., SPIELMAN, A. (2004) Global warming and malaria: a call for accuracy. Lancet Infect Dis 4: 323-4

ROBERT, V., CARNEVALE, P. (1984) Les vecteurs du Paludisme en Afrique sub-saharienne. . Etudes Médicales: 79-90

ROBERTS, J. R., REIGART, J. R. (2004) Does anything beat DEET? Pediatr Ann 33: 443-53

- ROGAN, W. J., CHEN, A. (2005) Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). *Lancet* 366: 763-73
- ROUSH, R. T. (1993) Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitol Today* 9: 174-9
- ROWLAND, M., FREEMAN, T., DOWNEY, G., HADI, A., SAEED, M. (2004a) DEET mosquito repellent sold through social marketing provides personal protection against malaria in an area of all-night mosquito biting and partial coverage of insecticide-treated nets: a case-control study of effectiveness. *Trop Med Int Health* 9: 343-50
- ROWLAND, M., DOWNEY, G., RAB, A., FREEMAN, T., MOHAMMAD, N., REHMAN, H., DURRANI, N., REYBURN, H., CURTIS, C., LINES, J., FAYAZ, M. (2004b) DEET mosquito repellent provides personal protection against malaria: a household randomized trial in an Afghan refugee camp in Pakistan. *Trop Med Int Health* 9: 335-42
- SCHAEFER, C., PETERS, P. W. (1992) Intrauterine diethyltoluamide exposure and fetal outcome. *Reprod Toxicol* 6: 175-6
- SCHOENIG, G. P., HARTNAGEL, R. E., JR., SCHARDEIN, J. L., VORHEES, C. V. (1993) Neurotoxicity evaluation of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) in rats. *Fundam Appl Toxicol* 21: 355-65
- SERVICE, M. (1993) Mosquitoes (Culicidae) Medical insects and Arachnids. Chapman and Hall, London, pp 51-77
- SHAFFER, T. J., MEYER, D. A., CROFTON, K. M. (2005) Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environ Health Perspect* 113: 123-36
- SNOW, R. W., BRADLEY, A. K., HAYES, R., BYASS, P., GREENWOOD, B. M. (1987) Does woodsmoke protect against malaria? *Ann Trop Med Parasitol* 81: 449-51
- SNOW, R. W., GUERRA, C. A., NOOR, A. M., MYINT, H. Y., HAY, S. I. (2005) The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature* 434: 214-7
- SODERLUND, D. M., BLOOMQUIST, J. R. (1989) Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: Roush, R. T., Tabashnik, B. E. (eds) *Pesticides resistance in arthropods*. Chapman and Hall, New York, pp 58-96
- TABASHNIK, B. E. (1989) Managing resistance with multiple pesticide tactics: theory, evidence, and recommendations. *J Econ Entomol* 82: 1263-9
- TABASHNIK, B. E., CROFT, B. A. (1982) Managing pesticide resistance in crop-arthropod complexe"s : interactions between biological and operational factors. *Environ. Entomol* 11
- TAYLOR, C. E., GEORGHIOU, G. P. (1979) Suppression of insecticide resistance by alteration of gene dominance and migration. *J. Econ. Entomol.* 72: 105-109
- TENENBEIN, M. (1987) Severe toxic reactions and death following the ingestion of diethyltoluamide-containing insect repellents. *Jama* 258: 1509-11
- TOMLIN, C. D. S. (2007) The e-Pesticide Manuel, a World Compendium. British Crop Protection Council, London, United Kingdom.
- TOURE, Y. T., PETRARCA, V., COLUZZI, M. (1983) [Nuove entita del complesso *Anopheles gambiae* in Mali. *Parassitologia* 25: 367-370

- TOURE, Y. T., PETRARCA, V., TRAORE, S. F., COULIBALY, A., MAIGA, H. M., SANKARE, O., SOW, M., DI DECO, M. A., COLUZZI, M. (1998) The distribution and inversion polymorphism of chromosomally recognized taxa of the *Anopheles gambiae* complex in Mali, West Africa. *Parassitologia* 40: 477-511
- VARMUS, H., KLAUSNER, R., ZERHOUNI, E., ACHARYA, T., DAAR, A. S., SINGER, P. A. (2003) Public health. Grand Challenges in Global Health. *Science* 302: 398-9
- VATANDOOST, H., MCCAFFERY, A. R., TOWNSON, H. (1996) An electrophysiological investigation of target site insensitivity mechanisms in permethrin-resistant and susceptible strain of *Anopheles stephensi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 216
- VAUGHAN, A., HEMINGWAY, J. (1995) Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Biol Chem* 270: 17044-17049
- VERSCHOYLE, R. D., BROWN, A. W., NOLAN, C., RAY, D. E., LISTER, T. (1992) A comparison of the acute toxicity, neuropathology, and electrophysiology of N,N-diethyl-m-toluamide and N,N-dimethyl-2,2-diphenylacetamide in rats. *Fundam Appl Toxicol* 18: 79-88
- VIA, S. (1986) Quantitative genetic models and the evolution of pesticide resistance. In: Pesticide resistance strategies and tactics for management. National Academy of Science, Washington, D.C., pp 222-235
- WEILL, M., LUTFALLA, G., MOGENSEN, K., CHANDRE, F., BERTHOMIEU, A., BERTICAT, C., PASTEUR, N., PHILIPS, A., FORT, P., RAYMOND, M. (2003) Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423: 136-7
- WHO. (2000) In: A Strategic Framework for Malaria Prevention and Control During Pregnancy in the African Region
- WHO. (2005a) The world malaria report 2005. Geneva, World Health Organization: Available: <http://rbm.who.int/wmr2005/>
- WHO. (2005b) In: Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to anti malarial drugs. Report on global monitoring 1996-2004
- WHO. (2006) Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs). In: World_Health_Organization (ed.) WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDDP/2006.3
- WILLIAMSON, M. S., MARTINEZ-TORRES, D., HICK, C. A., DEVONSHIRE, A. L. (1996) Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol Gen Genet* 252: 51-60
- WOREK, F., KOLLER, M., THIERMANN, H., SZINICZ, L. (2005) Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology* 214: 182-9
- WRIGHT, R. H. (1975) Why mosquito repellents repel insects. *Scientific American* 233: 104-111
- XUE, R. D., ALI, A., BARNARD, D. R. (2003) Laboratory evaluation of toxicity of 16 insect repellents in aerosol sprays to adult mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 19: 271-4
- YAWSON, A. E., MCCALL, P. J., WILSON, M. D., DONNELLY, M. J. (2004) Species abundance and insecticide resistance of *Anopheles gambiae* in selected areas of Ghana and Burkina Faso. *Med Vet Entomol* 18: 372-7

ZAIM, M., GUILLET, P. (2002) Alternative insecticides: an urgent need. Trends Parasitol 18: 161-3

ZAIM, M., AITIO, A., NAKASHIMA, N. (2000) Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. Med Vet Entomol 14: 1-5

ZLOTKIN, E. (1999) The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. Annu Rev Entomol 44: 429-55

Article 1 : Am J Trop Med Hyg, 2005. 72 (6), 739-744.

Combining a non-pyrethroid insecticide and a repellent : a new approach for controlling Kdr resistant mosquitoes.

Pennetier C, Corbel V & Hougard JM.

COMBINATION OF A NON-PYRETHROID INSECTICIDE AND A REPELLENT: A NEW APPROACH FOR CONTROLLING KNOCKDOWN-RESISTANT MOSQUITOES

CEDRIC PENNETIER, VINCENT CORBEL, AND JEAN-MARC HOUGARD

Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France;
Centre Institut de Recherche pour le Développement du Bénin, Cotonou, Bénin

Abstract. Although pyrethroid-treated materials are a promising tool for the prevention and the control of dengue in the tropics, the development of pyrethroid resistance in the main mosquito vector (*Aedes aegypti*) may negate their use for personal and/or community protection. In that context, the efficacy of a mixture of a repellent (N,N-diethyl toluamide [DEET]) and a non-pyrethroid insecticide (propoxur) was investigated under laboratory conditions against both pyrethroid-susceptible and pyrethroid-resistant mosquitoes with the knockdown resistance (*kdr*) mutation. The results showed that a combination of propoxur and DEET induced a knockdown effect and mortality as high as deltamethrin (a standard pyrethroid) against the susceptible strain, and significantly higher efficacy against the pyrethroid-resistant strain. This could be explained mainly by the existence of a strong synergistic interaction between DEET and propoxur in mosquitoes. This study constitutes a first step towards an alternative strategy for improving mosquito control in areas with pyrethroid resistance.

INTRODUCTION

Pyrethroid insecticides represent important weapons against pests of both economic and medical importance. They share many properties with dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT), including a knock down and killing effect, resulting from action against the sodium channels of the peripheral and central nervous systems.¹ These products show remarkably high efficacy against insects but relatively low mammalian toxicity and low persistence in the environment.² Since the 1980s, pyrethroids have been widely used as residual sprays on house walls or on mosquito nets to control insects in the domestic environment.³ Among these anti-vector measures, pyrethroid-treated nets have emerged in recent years as the most promising tool for reducing malaria mortality and morbidity, especially in children less than five years of age in disease-endemic areas in Africa.⁴ Insecticide-treated materials (ITMs), which include plastic sheeting, curtains, hammocks, textiles, combat uniforms, or lids of water tanks, have increased importance in personal and community protection against pests and vectors that transmit malaria, typhus, or dengue.⁵

Unfortunately, the emergence of pyrethroid resistance in most mosquito species of public health importance represents a threat for sustainable vector control programs implemented in the tropics. The difficulties come from the fact that resistance to any pyrethroid generally confers cross-resistance to all others, thus limiting the number of effective alternatives suitable for vector control. The knockdown resistance (*kdr*) gene, which confers cross-resistance to DDT and pyrethroids, is now widely prevalent in mosquitoes of public health importance.^{6–9} In *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*, the *kdr* mutation is conferred by a single amino acid change (one or both of the two known sites) in the axonal sodium channel insecticide-binding site, whereas knockdown resistance emerged from four amino acid substitutions in *Aedes aegypti*.^{9,10}

The impact of the *kdr* mutation on the efficacy of ITMs has been the subject of numerous studies in Africa the past decade.^{11–13} It has been generally observed that the *kdr* mutation was not sufficient to render pyrethroid-treated nets ineffective, which would result in a relatively high efficacy of

impregnated bed nets in killing resistant mosquitoes, but not repelling them.^{14,15} Such a finding was explained by the fact that resistant mosquitoes, which were less irritated by the insecticide, remained longer on the nets before finally receiving sufficient lethal doses by tarsal contact.¹⁶ This low irritancy may represent a serious risk against personal protection. A recent experimental hut study carried out in Benin has shown that the proportion of blood-fed females exposed to permethrin-impregnated nets was significantly higher in resistant (R) mosquitoes (both in heterozygous [RS] and homozygous [RR] individuals) than in susceptible (S) ones.¹³ Such findings, which need be confirmed with different insecticides and impregnated substrates, already strengthen the need for alternative chemicals and/or vector control strategies to maintain an effective barrier against pyrethroid-resistant mosquitoes. This is even more relevant for insecticide-treated fabrics or clothing that should maintain a fast-acting effect against resistant insects.

Since the number of new insecticides is drastically dwindling, an alternative strategy to maintain the global effectiveness of ITMs in areas of pyrethroid resistance may be the replacement of pyrethroids by other insecticides such as carbamates or organophosphates.¹⁷ Although carbamate- or organophosphate-impregnated materials have shown efficacy against pyrethroid-resistant mosquitoes, their low excitorepellency allows mosquitoes to remain a sufficient time on the impregnated surface to take a blood meal.^{11,18–20} Such findings may negate their use in textile or fabric impregnations.

To overcome such limitations for personal protection, we propose an alternative concept to maintain the effectiveness of impregnated materials. This consists of associating a synthetic repellent with a non-pyrethroid insecticide to mimic similar or higher features of pyrethroids, especially irritancy, against pyrethroid-resistant mosquitoes. In this study, DEET, which is a classic synthetic repellent used since World War II for personal protection, was combined with propoxur, a carbamate insecticide, which has high insecticidal activity but low irritant properties against insects.^{21,22} The objectives of this study were to compare the intrinsic efficacy of this non-pyrethroid DEET-propoxur mixture with a reference pyrethroid insecticide (deltamethrin), and to search for synergistic

interactions between these two compounds. Susceptible and *kdr*-resistant strains of *Ae. aegypti*, an important vector for arboviruses, were used for this study.

MATERIALS AND METHODS

Mosquitoes. Two laboratory strains of *Ae. aegypti* were used in this study. The susceptible Bora strain originated in French Polynesia and has no detectable insecticide resistance mechanism. The pyrethroid-resistant strain LHP originated in Vietnam and was already strongly resistant to permethrin when it was collected in the field. This strain has been maintained under constant permethrin selection at each generation and is now homozygous for the *kdr* gene (mutation L75W).⁹ The resistant and susceptible strains were evaluated every three months for resistance status and the R genotype.

Insecticides and repellent. Bioassays were made with technical grade propoxur, DEET, and deltamethrin, the latter of which served as a reference for pyrethroids. The active ingredient of deltamethrin ((S)-alpha-cyano-3-phenoxybenzyl(1R,3R)-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate) had a purity of 91.5% and contained at least 98% of the cis isomer. Propoxur (2-isopropoxyphenyl methylcarbamate) had a purity of 98.4%. DEET had a purity of 97% and contained a minimum of 95% of the meta isomer, the most effective molecule of DEET.

Substrates and treatment. Tarsal contact tests were conducted using filter paper treated with the technical grade of each insecticide and repellent. Filter papers were treated following a World Health Organization (WHO) protocol using acetone solutions of insecticide and silicone oil as the carrier.²³ The impregnation was done by dripping evenly onto the paper 2 mL of technical grade substance dissolved in acetone and silicone oil. The paper was dried for 12 hours before the test.

Tarsal contact with treated filter paper. The knockdown effect and mortality resulting from tarsal contact with treated filter paper were measured using WHO test kits against adult mosquitoes.²³ Concentrations were expressed in weight per weight percentage of active ingredient in silicone oil. Batches of 25 non-blood-fed female mosquitoes (2–5 days old) were introduced into holding tubes and maintained for 60 minutes at 27 ± 2°C at a relative humidity of 80 ± 10%. They were then transferred into exposure tubes and placed vertically for 60 minutes under subdued light. Since pyrethroids are fast-acting insecticides, the number of knocked-down mosquitoes at the bottom of the tubes was recorded every 10 minutes. Mortality was recorded 24 hours after exposure and corrected by the formula of Abbott²⁴ if necessary. Data were analyzed by the log-probit method of Finney²⁵ using Probit software.²⁶ Times after which 50% and 95% of mosquitoes were knocked down (KDT_{50} and KDT_{95} , respectively) and their 95% confidence intervals were estimated with Probit software. Each solution was tested four times and each test was repeated three times with different insect batches to take into account inter-test variability.

Irritability tests. Non-blood-fed female mosquitoes (2–5 days old) were individually introduced into plastic cones fitted with treated filter paper. After exposure 60 seconds, the time elapsed between the first landing and the next take off of the mosquito was recorded as the time for first take off.²⁷ Mosquitoes that did not take off at least once during a period

of 256 seconds were discarded. For each test, 50 mosquitoes were tested individually. A simple program using the internal clock of a laptop computer has been developed in our laboratory in France to conduct this test and analyze the data. Mosquitoes were grouped by classes of first take off time and cumulative frequencies were used to calculate the time for which 50% and 95% of the mosquitoes take off (FT_{50} and FT_{95} , respectively) using Probit software. Fairly constant subdued lighting and air temperature (28 ± 2°C) were maintained during the test according to Hodjati and Curtis.²⁸

Experimental design. Lethal concentrations of propoxur that induced 30% mortality (LC_{30}) were first determined for each strain of *Ae. aegypti* to allow better detection of synergistic interactions with DEET. The maximum irritant concentration of DEET was then determined on the susceptible strain. Therefore, the efficacy of DEET-propoxur mixtures, in terms of mortality, knockdown effect and irritancy, was compared with deltamethrin at the LC_{100} (chosen as a pyrethroid reference concentration). To detect any synergism between DEET and propoxur, we compared the results observed with the DEET-propoxur mixture with those theoretically expected in the absence of any interaction (uncorrelated joint action) between the two compounds.²⁹ The expected mortality was calculated by multiplying the survival rates of each compound tested separately and subtracting the result from 100%.

In the same way, the expected KDT and FT for the mixture was calculated by multiplying the percentage of mosquitoes that were not knocked down (air-landed mosquitoes) at each time and subtracting the results from 100%. Synergism occurred when the observed results were significantly higher than the expected one. Conversely, when the observed results were significantly lower than the expected one, there was antagonism.

Statistical analysis. Mortality rates for DEET and propoxur alone and combined were compared with Yates' corrected chi-square test at 0.05% level of significance. The differences between two KDT_{50-95} and two FT_{50-95} values were considered significant if their 95% confidence intervals did not overlap.

RESULTS

Preliminary data. The maximum irritant concentration of 1% DEET induced no mortality and no knockdown effect (Tables 1 and 2). The LC_{30} s of propoxur were 0.02% and 0.01% for the Bora and LHP strains, respectively. At this concentration, propoxur induced no knockdown effect and only low irritancy against both mosquito strains (Tables 2 and 3). The LC_{100} of deltamethrin was estimated to be 0.014% for the Bora strain. The DEET-propoxur mixtures tested on mosquitoes were 0.02% propoxur plus 1% DEET for the Bora strain and 0.01% propoxur plus 1% DEET for the LHP strain. All results (mortality, knockdown effect, and irritancy) obtained with each insecticide and repellent, alone or in mixture, are summarized in Tables 1, 2 and 3.

Comparative efficacy between deltamethrin and the DEET-propoxur mixture. The mortality rate of the Bora strain (100%) when tested with deltamethrin did not differ significantly from that with DEET-propoxur mixture (96%) ($\chi^2 = 2.30$, degrees of freedom [df] = 1, $P = 0.13$) (Table 1), but the knockdown effect was significantly higher than with

TABLE 1

Mortality at 24 hours of susceptible (Bora) and kdr-resistant (LHP) *Aedes aegypti* mosquitoes exposed for one hour to papers impregnated with deltamethrin, propoxur, and DEET, separate or combined*

		Insecticidal effect			χ^2 (P)
		Dose, %	No.	% mortality	
<i>Ae. aegypti</i> (Bora)	Control	—	300	No effect	—
	Propoxur LC ₃₀	0.02	300	34.0	—
	DEET	1	300	No effect	—
	Mixture (observed)	0.02 + 1	300	96.0	81.78† (< 0.0001)
	Mixture (expected)	—	—	34.0	—
<i>Ae. aegypti</i> (LHP)	Deltaméthrine LC ₁₀₀	0.014	300	100.0	2.30‡ (0.1297)
	Control	—	300	No effect	—
	Propoxur LC ₃₀	0.01	275	34.5	—
	DEET	1	300	No effect	—
	Mixture (observed)	0.01 + 1	300	94.6	76.51† (< 0.0001)
	Mixture (expected)	—	—	34.5	—
	Deltamethrin LC ¹⁰⁰	0.014	300	9.3	144.73‡ (< 0.00001)

* Kdr = knock down resistance; DEET = N, N-diethyl-toluamide; LC = lethal concentration.

† Chi square and its probability between expected and observed mortalities.

‡ Chi square and its probability between deltamethrin and mixture-induced mortalities.

the DEET-propoxur mixture (both at the KDT₅₀ and KDT₉₅ levels) (Table 2). Irritancy of deltamethrin was greater than that of the DEET-propoxur mixture at the FT₅₀ level, but not significantly different at the FT₉₅ level (Table 3).

The mortality rate of the LHP strain when tested with deltamethrin was fairly low (9%), but remained high (94%) with the DEET-propoxur mixture ($\chi^2 = 144.73$, df = 1, $P < 0.0001$) (Table 1). In addition, the knockdown effect of deltamethrin was not observed in the LHP strain, but was high in the Bora strain (Table 2). The irritant properties of deltamethrin and the DEET-propoxur mixture did not differ significantly from each other at both the FT₅₀ and FT₉₅ levels (confidence intervals overlapped) (Table 3).

Interaction between DEET and propoxur. The DEET-propoxur mixture showed a significantly higher mortality rate (96%) in the Bora strain than expected (34%) when testing the hypothesis of an uncorrelated joint action of the two compounds ($\chi^2 = 81.78$; df = 1, $P < 0.0001$) (Table 1). Such results indicate a strong synergism between propoxur and DEET. Moreover, the existence of a knockdown effect with

the DEET-propoxur mixture also provided evidence for a striking synergism between these two compounds since DEET and propoxur tested separately did not induce any knockdown effect (Table 2). However, irritancy of the DEET-propoxur mixture was not significantly different from that theoretically expected, indicating an additive effect for this parameter (Table 3).

A synergistic interaction was also observed between DEET and propoxur in the LHP strain for both the mortality rate (94.5% versus 34.5%; $\chi^2 = 76.51$, df = 1, $P < 0.0001$) (Table 1) and the knockdown effect (KDT₅₀ = 41.5 minutes) (Table 2). Conversely, irritancy of the DEET-propoxur mixture was significantly lower than that theoretically expected, indicating an antagonistic interaction between these two compounds (confidence intervals did not overlap) (Table 3).

DISCUSSION

The combination of propoxur (at the LC₃₀) and DEET (at a sub-lethal dose) showed irritant properties as high as del-

TABLE 2

Knock-down times (KDT₅₀ and KDT₉₅) of susceptible (Bora) and kdr-resistant (LHP) *Aedes aegypti* mosquitoes exposed for one hour to papers impregnated with deltamethrin, propoxur, and DEET, separate or combined*

		Knock-down effect				
		Dose, %	No.	KDT ₅₀ (min)	95% CI	KDT ₉₅ (min)
<i>Ae. aegypti</i> (Bora)	Control	—	300	No effect	—	No effect
	Propoxur LC ₃₀	0.02	300	No effect	—	No effect
	DEET	1	300	No effect	—	No effect
	Mixture (observed)	0.02 + 1	300	36.6	35.7–37.4	54.8
	Mixture (expected)	—	—	—	—	—
<i>Ae. aegypti</i> (LHP)	Deltamethrin LC ₁₀₀	0.014	300	23.8	21.6–26.2	38.3
	Control	—	300	No effect	—	No effect
	Propoxur LC ₃₀	0.01	300	No effect	—	No effect
	DEET	1	300	No effect	—	No effect
	Mixture (observed)	0.01 + 1	300	41.5	40.6–42.4	60.1
	Mixture (expected)	—	—	—	—	—
	Deltamethrin LC ₁₀₀	0.014	300	No effect	—	No effect

* KDT₅₀ = 50% knock-down time; KDT₉₀ = 90% knock-down time; DEET = N, N-diethyl-toluamide; CI = confidence interval; LC = lethal concentration.

TABLE 3

Time of first take-off (FT₅₀ and FT₉₅) of susceptible (Bora) and kdr-resistant (LHP) *Aedes aegypti* mosquitoes exposed to papers impregnated with deltamethrin, propoxur, and DEET, separate or combined.*

		Dose, %	No.	Irritant effect			
				FT ₅₀ (sec)	95% CI	FT ₉₅ (sec)	95% CI
<i>Ae. aegypti</i> (Bora)	Control	—	163	251	188.8–363.9	6,256.1	3,122.2–16,269.7
	Propoxur LC ₃₀	0.02	150	133.9	108.8–172.3	2,508.1	1,486.7–4,993.3
	DEET	1	150	24.2	21.9–26.8	128.2	107.6–157.4
	Mixture (observed)	0.02 + 1	150	21.5	18.7–24.6	88.9	69.7–114.7
	Mixture (expected)	—	—	19.2	17.0–21.7	96.4	78.7–123.3
	Deltamethrin LC ₁₀₀	0.014	150	15.4	13.9–17.1	86.9	72.9–106.8
<i>A. aegypti</i> (LHP)	Control	—	150	81.2	63.8–104.0	739.3	379.0–1,501.8
	Propoxur LC ₃₀	0.01	153	62.5	54.0–73.6	856.9	607.3–1,308.0
	DEET	1	150	23.6	19.3–28.9	172.1	116.1–257.8
	Mixture (observed)	0.01 + 1	152	23.6	21.2–26.2	159.3	133.2–195.8
	Mixture (expected)	—	—	15.8	14.0–17.9	101.6	81.1–133.2
	Deltamethrin LC ₁₀₀	0.014	152	24.1	21.5–27.0	183.2	148.0–236.1

* FT₅₀ = 50% take-off time; FT₉₅ = 95% take-off time; DEET = N, N-diethyl-toluamide; CI = confidence interval; LC = lethal concentration.

tamethrin (at the LC₁₀₀) against both Bora and LHP mosquito strains, although irritancy was slightly lower against LHP mosquitoes. In the LHP strain, the decrease in irritancy with deltamethrin might be due to the presence of the *kdr* mutation, although it probably results from a more complex phenomenon for the DEET-propoxur combination. It is likely that the massive knockdown effect observed with the DEET-propoxur mixture disrupted the time for first take off of mosquitoes, since knocked-down mosquitoes were unable to fly. This phenomenon probably explained the antagonistic interaction in irritancy observed between propoxur and DEET in the LHP strain.

A strong synergism was reported between an insecticide and a repellent. The level of synergy detected with this non-pyrethroid DEET-propoxur mixture was higher than those previously observed between pyrethroids and carbamates (e.g., propoxur) or organophosphates against *Anopheles* mosquitoes.^{30,31} The most intriguing result was the manifestation of a knockdown effect induced by compounds other than pyrethroids, especially against LHP mosquitoes. Such findings are of practical importance since the knockdown effect is an essential characteristic in personal protection against mosquito bites.

The physiologic mechanisms responsible for synergistic interactions between DEET and propoxur remain unclear. The mode of action of carbamates is well known (inhibition of acetylcholinesterase), but that of DEET has not been elucidated.³² Davis proposed several assumptions to explain the effect of DEET in insects³³: 1) inhibition of an attraction signal; 2) inversion of attraction signal perception for an irritant message; 3) activation of a receptor system that could mediate a competing or inappropriate behavior pattern; 4) activation of a noxious odor receptor; and 5) activation of different receptors that could mediate various behavior patterns, indicating that repellents are interfering with the sensory information system.

In this study, we used filter papers without any vertebrate host. DEET acts not only by inducing a disruption of an attraction signal, but also by generating a physiologic perturbation in mosquitoes. Indeed, preliminary bioassays have shown that a DEET concentration range of 5–10% induced mortality and a knockdown effect as great as pyrethroids (Pennetier C, unpublished data). In addition, electrophysi-

ologic tests with dorsal unpaired median neurons of American cockroach (*Periplaneta americana*) showed that DEET induced a strong neurotoxic effect (Lapied B, unpublished data). As previously observed by Corbel and others³⁴ with insecticide combinations, synergism between DEET and propoxur may be the result of a general physiologic disruption involving different target sites in the central nervous system. Further investigations are now in progress to determine precisely the mode of action of DEET alone and in combination with other compounds on insect physiology.

Another possible explanation for the observed synergism is detoxification by enzymes in insects. One component of the DEET-propoxur mixture may interfere with the detoxification of the other, thereby increasing the toxicity of the two compounds.^{35,36} For example, synergism between organophosphates and pyrethroids was caused by sequestration of organophosphates by esterases, which prevented the degradation of pyrethroids.³⁷ Although DEET does not share ester bonds, other enzymes such as oxidases have been shown to be involved in its detoxification and could therefore play a role in synergism.^{38–40}

In conclusion, a DEET-propoxur mixture may be a new promising tool for vector control because pyrethroid resistance is now widely prevalent in mosquitoes worldwide, especially in Africa. The control of *Ae. aegypti*, which is based mainly on pyrethroid sprays or impregnated materials, is being threatened by pyrethroid resistance. A combination of DEET and propoxur (or others carbamates) may improve personal protection against *kdr*-resistant mosquitoes and contribute to a better management of pyrethroid resistance. Another use for such a mixture stems from the fact that the *Ace.1^R* mutation (G119S), which confers cross-resistance to organophosphates and carbamates, has never been observed in *Ae. aegypti*, and is unlikely to appear since it requires a double mutation.^{41,42} In contrast to *Ae. aegypti*, the *Ace.1^R* mutation has been found in *An. gambiae*, the main malaria vector in Africa and in *Cx. quinquefasciatus*, the main urban mosquito in tropical areas.⁴³ It will be interesting to investigate the impact of the *Ace.1^R* gene on the efficacy of this DEET-propoxur mixture. Since DEET is a volatile compound, there is an urgent need to search for an adequate formulation that could extend the residual effect of this combination in impregnated materials. Recent investigations in

the laboratory have shown that efficacy of a DEET-based formulation (Insect Ecran®; Osler, Paris, France) persisted for at least 45 days on netting against pyrethroid-resistant *Cx. quinquefasciatus* (N'Guessan R, unpublished data). These findings constitute a first step towards an alternative strategy of combating vectors of human diseases.

Received September 24, 2004. Accepted for publication December 13, 2004.

Acknowledgments: We are very grateful to Raphael N'Guessan (London School of Hygiene and Tropical Medicine) for helpful comments and discussions. We also thank Bayer (Leverkusen, Germany), Agrevo (Berkhamsted, United Kingdom), and Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) for providing the technical grades of pro-poxur, deltamethrin, and DEET.

Authors' addresses: Cédric Pennetier and Vincent Corbel, Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France, Telephone: 33-467-04-19-24, Fax: 33-467-54-20-44, E-mails: cedric.pennetier@ird.fr and corbel@mpl.ird.fr. Jean-Marc Hougard, Centre Institut de Recherche pour le Développement du Benin, 01 BP 4414 RP, Cotonou, Benin, Telephone: 229-30-03-54, Fax: 229-30-88-60, E-mail: hougard@ird.fr.

REFERENCES

- Elliott M, Janes NF, Jeffs KA, Needham PH, Sawicki RM, 1965. New pyrethrin-like esters with high insecticidal activity. *Nature* 207: 938–940.
- Elliot M, Janes NF, 1978. Synthetic pyrethroids—a new class of insecticides. *Chem Soc Rev* 7: 473–505.
- Zaim M, Aitio A, Nakashima N, 2000. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol* 14: 1–5.
- Lengeler C, 2004. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev*: CD000363.
- World Health Organization, 1997. *Vector Control: Methods for Use by Individuals and Communities*. Geneva: World Health Organization, 52–177.
- Martinez-Torres D, Foster SP, Field LM, Devonshire AL, Williamson MS, 1999. A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Mol Biol* 8: 339–346.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, 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.
- Chandre F, Darriet F, Manguin S, Brengues C, Carnevale P, Guillet P, 1999. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Coté d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc* 15: 53–59.
- Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J, 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* 17: 87–94.
- Hemingway J, Ranson H, 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 45: 371–391.
- Kolaczinski JH, Fanello C, Herve JP, Conway DJ, Carnevale P, Curtis CF, 2000. Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bed-nets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance. *Bull Entomol Res* 90: 125–132.
- Darriet F, Guillet P, N'Guessan R, Doannio JM, Koffi A, Konan LY, Carnevale P, 1998. Impact of resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets. *Med Trop (Mars)* 58-4: 349–354.
- Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbeto M, Lardeux F, Hougard JM, Guillet P, 2004. Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gam-*
- biae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malar J* 3-1: 22–30.
- Darriet F, Guillet P, N'Guessan RN, Doannio JMC, Koffi AA, Konan LY, Carnevale P, 1999. *The Impact of Permethrin and Deltamethrin Resistance in Anopheles gambiae s.s. on Efficacy of Insecticide-Treated Mosquito Nets*. Geneva: World Health Organization. WHO/VBC/99.1002.
- Darriet F, N'Guessan R, Koffi AA, Konan L, Doannio JM, Chandre F, Carnevale P, 2000. Impact of pyrethrin resistance on the efficacy of impregnated mosquito nets in the prevention of malaria: results of tests in experimental cases with deltamethrin. *Bull Soc Pathol Exot* 93-2: 131–134.
- Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, Guillet P, 2000. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Med Vet Entomol* 14: 81–88.
- Curtis CF, Miller JE, Hodjati MH, Kolaczinski JH, Kasumba I, 1998. Can anything be done to maintain the effectiveness of pyrethroid-impregnated bed-nets against malaria vectors? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 353-1376: 1769–1775.
- Fanello C, Carneiro I, Ilboudo-Sanogo E, Cuzin-Ouattara N, Baldolo A, Curtis CF, 2003. Comparative evaluation of carbosulfan- and permethrin-impregnated curtains for preventing house-entry by the malaria vector *Anopheles gambiae* in Burkina Faso. *Med Vet Entomol* 17-3: 333–338.
- N'Guessan R, Darriet F, Guillet P, Carnevale P, Traore-Lamizana M, Corbel V, Koffi AA, Chandre F, 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol* 17-1: 19–25.
- Curtis CF, Mnzava AE, 2000. Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control. *Bull World Health Organ* 78-12: 1389–1400.
- Qiu H, Jun HW, McCall JW, 1998. Pharmacokinetics, formulation, and safety of insect repellent N,N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET): a review. *J Am Mosq Control Assoc* 14-1: 12–27.
- Curtis CF, Mnzava AE, 2000. Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control. *Bull World Health Organ* 78-12: 1389–1400.
- World Health Organization, 1998. *Report of WHO Informal Consultation Tests Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vectors, Bio-efficacy and Persistence of Insecticides on Treated Surfaces*. Geneva: World Health Organization. WHO/CDS/CPC/MAL/98.12.
- Abbott WS, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18: 265–267.
- Finney DJ, 1971. *Probit Analysis*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Raymond M, Prato G, Ratsira D, 1997. *Probit and Logit Analysis Program Version 2.0*. Montpellier, France: Centre National de Scientifique.
- Mouchet J, Cavalie P, Callies JM, Marticou H, 1961. Irritability with respect to DDT of *Anopheles gambiae* and *A. funestus* in northern Cameroon. *Riv Malariol* 40: 191–217.
- Hodjati MH, Curtis CF, 1999. Effects of permethrin at different temperatures on pyrethroid-resistant and susceptible strains of *Anopheles*. *Med Vet Entomol* 13-4: 415–422.
- Bliss CI, 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol* 26: 585–615.
- Corbel V, Darriet F, Chandre F, Hougard JM, 2002. Insecticide mixtures for mosquito net impregnation against malaria vectors. *Parasite* 9: 255–259.
- Darriet F, Corbel V, Hougard JM, 2003. Efficacy of mosquito nets treated with a pyrethroid-organophosphorous mixture against Kdr- and Kdr+ malaria vectors (*Anopheles gambiae*). *Parasite* 10: 359–362.
- Eldefrawi AT, Eldefrawi ME, 1976. Identification of a calcium-binding subunit of the acetylcholine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 70: 1020–1027.
- Davis EE, 1985. Insect repellents: concepts of their mode of action relative to potential sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 22: 237–243.
- Corbel V, Hue B, Bonnet J, Hougard JM, Lapiel B, 2004. Effects of pyrethroid and carbamate combinations on insect synaptic

- transmission. *Proceedings of IX European Multicolloquium of Parasitology*. Valencia, Spain. July 18–23, 2004
- 35. Corbett JR, 1974. *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*. New York: Academic Press.
 - 36. Wilkinson CF, 1976. Insecticide interactions. Wilkinson CF, ed. *Insecticide Biochemistry and Physiology*. New York: Plenum Press, 605–647.
 - 37. Gunning RV, Moores GD, Devonshire AL, 1999. Esterase inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoperva armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Biochem Physiol* 63: 50–62.
 - 38. Constantino L, Rosa E, Iley J, 1992. The microsomal demethylation of N,N-dimethylbenzamides. Substituent and kinetic deuterium isotope effects. *Biochem Pharmacol* 44: 651–658.
 - 39. Constantino L, Iley J, 1999. Microsomal metabolism of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET, DET): the extended network of metabolites. *Xenobiotica* 29: 409–416.
 - 40. Iley J, Constantino L, 1993. The microsomal dealkylation of N,N-dialkylbenzamides. *Biochem Pharmacol* 47: 275–280.
 - 41. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M, 2004. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* 13: 1–7.
 - 42. Weill M, Berthomieu A, Berticat C, Lutfalla G, Negre V, Pasteur N, Philips A, Leonetti JP, Fort P, Raymond M, 2004. Insecticide resistance: a silent base prediction. *Curr Biol* 14:R552–R553.
 - 43. Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, Chandre F, Berthomieu A, Berticat C, Pasteur N, Philips A, Fort P, Raymond M, 2003. Comparative genomics: Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* 423:693: 136–137.

Article 2 : Malaria J, 2007, Mar 29;6(1):38.

***Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides
strongly extends the efficacy of treated nets against Anopheles
gambiae.***

Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, Lapiel B & Hougard JM

Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*

Cédric Pennetier^{*1,2}, Vincent Corbel³, Pélagie Boko², Abibatou Odjo², Raphaël N'Guessan^{2,4}, Bruno Lapiède⁵ and Jean-Marc Hougard^{1,2}

Address: ¹Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Cotonou, Bénin, ²Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou (CREC), Cotonou, Bénin, ³Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France, ⁴London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK and ⁵RCIM, UPRES EA 2647, Université d'Angers, F-49045 Angers cedex, France

Email: Cédric Pennetier - Cedric.Pennetier@ird.fr; Vincent Corbel - vincent.corbel@mpl.ird.fr; Pélagie Boko - belombretta@yahoo.fr; Abibatou Odjo - abibatho@yahoo.fr; Raphaël N'Guessan - Raphael.N'Guessan@lshtm.ac.uk; Bruno Lapiède - bruno.lapiède@univ-angers.fr; Jean-Marc Hougard - jean-marc.hougard@ird.fr

* Corresponding author

Published: 29 March 2007

Received: 21 November 2006

Malaria Journal 2007, **6**:38 doi:10.1186/1475-2875-6-38

Accepted: 29 March 2007

This article is available from: <http://www.malariajournal.com/content/6/1/38>

© 2007 Pennetier et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: To manage the *kdr* pyrethroid-resistance in Anopheline malaria vectors, new compounds or new strategies are urgently needed. Recently, mixing repellents (DEET) and a non-pyrethroid insecticide (propoxur) was shown to be as effective as deltamethrin, a standard pyrethroid, under laboratory conditions, because of a strong synergy between the two compounds. In the present study, the interactions between two repellents (DEET and KBR 3023) and a non-pyrethroid insecticide (pyrimiphos methyl or PM) on netting were investigated. The residual efficacy and the inhibition of blood feeding conferred by these mixtures were assessed against *Anopheles gambiae* mosquitoes.

Methods: DEET and KBR 3023 were mixed with pyrimiphos methyl (PM), a organophosphate (OP) insecticide. The performance of mono- and bi-impregnated nets against adult mosquitoes was assessed using a miniaturized, experimental hut system (laboratory tunnel tests) that allows expression of behavioural responses to insecticide, particularly the mortality and blood feeding effects.

Results: Both mixtures (PM+DEET and PM+KBR3023) induced 95% mortality for more than two months compared with less than one week for each compound used alone, then reflecting a strong synergy between the repellents and PM. A similar trend was observed with the blood feeding rates, which were significantly lower for the mixtures than for each component alone.

Conclusion: Synergistic interactions between organophosphates and repellents may be of great interest for vector control as they may contribute to increase the residual life of impregnated materials and improve the control of pyrethroid-resistance mosquitoes. These results prompt the need to evaluate the efficacy of repellent/non-pyrethroid insecticide mixtures against field populations of *An. gambiae* showing high level of resistance to Ops and pyrethroids.

Background

Pyrethroid insecticides are currently the only chemicals recommended by World Health Organization Pesticide Scheme (WHOPES) for net impregnation because they show low mammalian toxicity and fast acting properties against mosquitoes [1]. Unfortunately, the knock-down resistance (*kdr*) gene conferring cross resistance to pyrethroids and DDT has become widespread in anopheline mosquitoes in Africa [2-5]. This resistance may represent a threat to the future success of malaria vector control programmes, based on insecticide-treated nets (ITNs) and indoor residual spraying (IRS). At present, there is uncertainty as to whether *kdr* undermines the effectiveness of ITN in areas of high prevalence. While experimental hut trial in Côte d'Ivoire [6] and Benin [6,7] demonstrated a survival advantage of mosquitoes being homozygous for the *kdr* resistance, other comparative trials between resistant and susceptible areas showed no apparent difference in the effectiveness of ITN [6,8,9]. The authors of this paper have previously suggested that resistant mosquitoes were less likely to be irritated by pyrethroid-treated nets than the susceptible and, therefore, aight for longer periods on ITNs and die [10,11]. This hypothesis was further explored by a randomized trial set up in Côte d'Ivoire which confirmed that ITNs remain effective in preventing malaria in areas where *Kdr* is prevalent [12].

Despite these controversial views, the reduced irritancy observed with ITNs against *kdr*-resistant mosquitoes represents a serious risk for personal protection. A typical example encountered in Benin was that significantly more individuals of the RS and RR genotypes blood fed in the presence of permethrin-treated nets than the susceptible SS [8]. Although carbamates and organophosphates are regarded as possible alternatives to pyrethroids [13,14], they may prove too hazardous for general use and may also select for insensitive acetylcholinesterase resistance in *An. gambiae* [13,15]. Developing alternative chemicals and/or vector control strategies to maintain an effective control of resistant mosquito populations has, therefore, become a priority.

In recent years, repellents have gained increasing interest in public health for protecting people against malaria vectors) [16-18]. DEET has been in use since the 1950s and is considered as the standard product against which all other repellents are measured [19]. Recently other active ingredients, known as IR3535 (ethyl butylacetylaminopropionate), KBR 3023 (Bayer), and PMD (para-menthane-3,8-diol) [19] have been formulated for skin application and showed equal or higher performances than DEET against mosquitoes [20]. Unfortunately, the issue with repellents concerns their short residual life which does not permit a long-term use in public health for personal protection. The application of repellents to fabrics, clothes or nets is a

relatively unexplored topic which has potential benefits in terms of safety and cost as direct contact with the chemicals is reduced and persistence enhanced [21,22]. A recent experimental hut trial conducted in pyrethroid resistant area in Côte d'Ivoire, showed that standard lotions of DEET and IR3535 applied on nets showed similar performances than pyrethroid-treated nets during a 6 weeks period [23]. The observed residual effect of DEET on net is far higher than that observed for skin application (6-8 hours)[18] but shorter than that observed with standard ITNs.

Particularly promising is the good protection obtained from combined use of repellents on skin and ITN for personal protection in Pakistan [16,17]. This example of integrated vector control shows the gains that can be obtained if interventions are used jointly to cover for any limitation in individual interventions [24]. Another promising concept is to associate on nets a synthetic repellent with a non-pyrethroid insecticide to reconstitute pyrethroid features in terms of excito-repellency and knock-down effect. In a recent laboratory trial, a combination of propoxur (carbamate) and DEET on filter papers resulted in a synergistic effect which induced strong mortality and KD effect against susceptible and pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* mosquitoes [25]. Such strategy may be promising for controlling malaria vectors which are becoming more and more resistant to the knock down and irritant effect of pyrethroids [8,11]. Through laboratory assays (tunnel test), the efficacy and persistence (mortality and blood feeding inhibition) of repellent-organophosphate mixtures on polyester nettings against *An. gambiae*, the main malaria vector in Africa, were investigated.

Methods

Biological material

The reference susceptible strain of *An. gambiae* Kisumu was used. This strain, originating from Kenya, has been colonized for many years and is free from any detectable insecticide resistance mechanism.

Insecticide and repellents

Three formulations, one organophosphate insecticide and two repellents, were evaluated on nets, separately or in mixture. Pirigrain® 250 is an Emulsifiable Concentrate formulation (EC) containing 25% pyrimiphos methyl (PM) and manufactured by Compagnie Générale des Insecticides (CGI, France). KBR 3023 (hydroxyethyl isobutyl piperidine carboxylate) is formulated as a liquid concentrate containing 25% of active ingredient. DEET (diethyl-3-methylbenzamide) is also formulated as a liquid concentrate containing 30% of active ingredient. The two experimental formulations of repellents are designed for clothing application and developed by Osler Company (France).

Net treatment

Netting samples to be tested in the tunnel apparatus were 75 denier multi-filament polyester, mesh 156, provided by Paluteck®, Benin. They were treated alone or in combination at 10 g/m² with DEET and KBR 3023 and 150 mg/m² with PM. These dosages have been selected after preliminary tests, as the lower dosages inducing 100% mortality in tunnel. Because repellents are volatile compounds, tests under tunnels were carried out near after the impregnation process (6 hours). Then blood-feeding inhibition and mortality were evaluated twice a week until efficacy dropped to values below 30%.

Study design and statistical analysis

The tunnel system is composed of a square glass cylinder, 25 cm high, 21 cm wide, 60 cm long, with a square of netting sizing 25 × 25 cm with nine 1 cm diameter holes fixed into a frame which slots across the tunnel dividing it into two chambers. In the bait chamber, a guinea pig is housed unconstrained in a cage and provided with food and water, and in the other chamber, 100 unfed female mosquitoes aged 5–8 days are released at dusk and left overnight in the dark. The following morning, the number of mosquitoes found live or dead, fed or unfed in each compartment was recorded.

Blood feeding reduction was assessed by comparing the proportion of blood-fed females (whether they were alive or dead) in treated and control tunnels. With each treatment, the blood feeding Inhibition rate (BFI) was calculated using the following formula:

$$BFI = 100 - \frac{(Treated * 100)}{Control} \quad \text{Eq.1}$$

Overall mortality was measured by pooling both immediate (12 hrs) and delayed (24 hrs) mortality of mosquitoes from the two sections of the tunnel. When control mortality exceeded 5%, treatment-induced mortality rates were corrected using the Abbott formula [29]:

$$\text{Corrected Mortality} = \frac{(Treated - Control)}{(100 - Control)} \quad \text{Eq.2}$$

The Lethal Time (LT) and Biting Inhibition Time (BIT) were afforded by each treatment by fitting a sigmoidal time-response model with GOSA® software [26] using the following formula:

$$Y = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + 10^{(\log LT_{95} - \log x) * slope}} \quad \text{Eq.3}$$

where (x) is the time (in days) entered without any transformation (i.e. not in logarithmic form). Y is the response (LT or BIT) which varies between a minimum (min) and

a maximum (max). LT_{95} and BIT_{95} are respectively the Lethal Time and Biting Inhibition Time (days) for Y 95% mortality or blood feeding between min and max respectively, i.e. the time after which 95% mosquitoes are dead or still unfed. Slope represents the slope of the curve at its midpoint.

In order to detect any synergy between PM and DEET or KBR, the results observed with the two mixtures with those theoretically expected in the absence of any interaction (uncorrelated joint action) between the two compounds were compared [27]. The expected mortality was calculated by multiplying the survival rates of each compound tested separately at each time class and subtracting the result from 100%, as follow:

$$Exp = 1 - ((1 - mort^{rep}) * (1 - mort^{pm})) \quad \text{Eq.4}$$

Expected values of mortality and blood feeding inhibition rate were also fitted using the same sigmoidal time-response model. Then observed and expected LT_{95} and BIT_{95} were compared. There was synergy when the observed results were significantly higher than the expected one. Conversely, there was antagonism when the observed results were significantly lower than the expected one. The differences between two LT_{50} and two BIT_{50} values were considered as significant if their 95% confidence intervals (CI_{95}) did not overlap.

Results

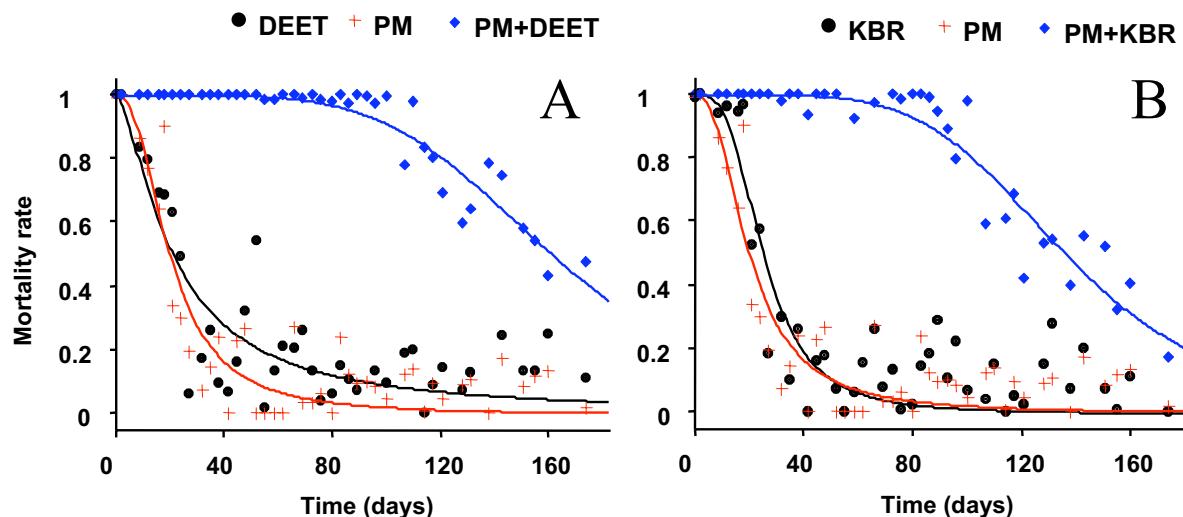
The mortality and blood feeding inhibition rates recorded during the evaluation are shown in Figure 1 and 2. Statistics are summarized in Table.

Lethal effect

When freshly treated, mortality of *An. gambiae* was 100% with each type of treatment (singles and mixtures). There was a more rapid decline in activity over time of the mono treatments than the mixtures. At their respective dosage, the LT_{95} of each chemical never exceeded 10 days ($LT_{95}^{\text{PM}} = 5.46 \text{ days} \pm 2.14$; $LT_{95}^{\text{DEET}} = 2.79 \text{ days} \pm 1.68$; $LT_{95}^{\text{KBR}} = 9.43 \text{ days} \pm 3.17$). KBR showed a LT_{95} similar to PM but significantly longer than DEET. The two mixtures DEET/PM and KBR/PM (Figure 1a and 1b) killed 95% mosquitoes for more than 60 days ($LT_{95}^{\text{PM+DEET}} = 87 \pm 11$; $LT_{95}^{\text{PM+KBR}} = 73 \pm 9$).

Blood feeding inhibition

Onset inhibition of blood feeding was total (100%) with every treatment. The time required to inhibit 95% of the blood feeding (BIT_{95}) was three days (± 3), six days (± 3) and eight days (± 5) for PM, DEET and KBR, respectively. There was no significant difference between the three molecules tested (Table 1). PM+DEET mixture induced 95% blood feeding inhibition for more than one month

**Figure 1**

Decline with time in treated nets efficacy. Mortality of *An. gambiae* Kisumu during overnight exposure to treated netting in tunnel test apparatus; Pyrimiphosmethyl was used at 150 mg/m² alone and combined with (a) DEET 10 g/m² and (b) KBR 10 g/m². Surimposed curves drawn according to sigmoidal time – response model of equation (3) whose parameters are shown in Table I.

($\text{BIT}_{95}^{\text{PM+DEET}} = 37 \pm 10$ days), whereas the effect lasted for three weeks only for the PM+KBR mixtures ($\text{BIT}_{95}^{\text{PM+KBR}} = 21 \pm 8$ days). The BIT of the mixtures was significantly longer than those observed when each compound was used separately (Figure 2a and 2b).

Synergy

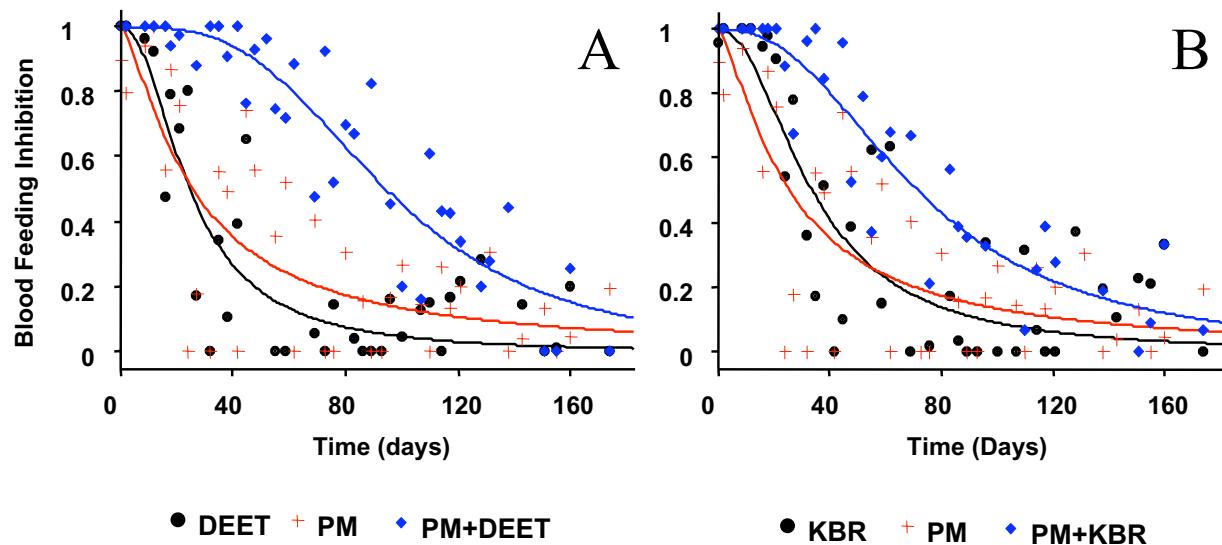
There were highly significant differences between expected and observed LT_{95} of PM+DEET and PM+KBR (95% CI do not overlap) indicating a strong synergy between PM and the repellents tested in terms of mortality (Table 1). A strong synergy was also noted with blood feeding inhibition, the observed BIT_{95} of the PM+DEET mixture being significantly greater than expected (Table 1). For the mixture PM+KBR, however, there was no significant difference between expected and observed blood feeding inhibition (overlapping of the confidence intervals), then suggesting a simple additive effect for blood feeding inhibition.

Discussion

When used separately, DEET and KBR on nets both induced, even for a few days, high mortality rates (more than 95%). This is a confirmation that DEET is not only a behavioural modifying chemical but also a toxicant as previously demonstrated by several authors [23,28-30]. The molecular events involved in DEET toxicity in insects is currently under investigation [31,32]. More surprising was the mortality observed with KBR 3023 in tunnel

apparatus. Indeed, KBR 3023 did not show insecticidal properties as DEET in previous works [30] but it was not tested on impregnated materials. However, the dose of KBR used in previous works (2 g/m² on filter papers) as well as the time of exposure (1 h in WHO test kits) was far below the one used in this study (10 g/m² and 12 hrs exposure). As far as residual efficacy is concerned, results with DEET are similar to those obtained in tunnel tests by N'Guessan et al. [23] in term of mortality but strongly different in term of blood feeding inhibition (three weeks of total protection vs. four days in this study). This difference may be due to the mosquito species used instead (*Culex quinquefasciatus*) and/or the formulations (DEET in alcohol versus liquid concentrate).

When used in mixtures, results clearly indicate that mixing an OP with a repellent significantly improve, at least under tunnel, the efficacy of nets against anopheline mosquitoes, both in terms of mortality and blood feeding inhibition. This is a confirmation of a previous study that showed a strong synergistic interaction between DEET and propoxur (carbamate) against *A. aegypti* mosquitoes [25]. In this study, thanks to synergy, it appears that a mixture combining an organophosphate insecticide with a repellent (DEET or KBR3023), is as effective as a most pyrethroids recommended by WHO for the treatment of mosquito nets [33]. Indeed, the overall efficacy of the mixtures was maintained for more than four months with PM+KBR3023 and five months PM+DEET in tunnel tests.

**Figure 2**

Decline with time in blood feeding inhibition. Blood feeding Inhibition provided by treated netting against *An. gambiae* Kisumu during overnight tests in tunnel test apparatus; Pyrimiphosmethyl was used at 150 mg/m² alone and combined with (a) DEET 10 g/m² and (b) KBR 10 g/m². Surimposed curves drawn according to sigmoidal time – response model of equation (3) whose parameters are shown in Table I.

Moreover, the tested mixture showed a residual effect longer than the one observed by other authors with chlopyriphos-methyl (one month at 100 mg/m²) (N'Guessan personal communication) and approximately similar to the one observed with PM alone (7 months versus 5 in our study) [34]. However, the dosage used was very high (1,000 mg/m²) compared to 150 mg/m² in the present study.

The great efficacy of these two repellent/OPs mixtures may offer interesting prospects for controlling malaria vectors.

It could be a promising strategy to manage *kdr*-resistant mosquitoes [25], since the non-pyrethroid mixture on net seems to be as effective as a pyrethroid insecticide. Another advantage is the considerable reduction of the insecticide amount on net, therefore, pledging the use of OPs on net. Next steps will consist in evaluating the efficacy and residual activity of these mixtures in experimental huts in the field. It would be also interesting to investigate the effectiveness of such mixtures against mosquitoes bearing other resistance mechanisms, such as the insensitive acetylcholine esterase (AChE^{IR}) [35].

Table I: Summary statistics for nets treated with Pyrimiphos-methyl (PM 150 mg/m²), DEET and KBR (both at 10 g/m²), alone and in combination against susceptible *An. gambiae*. Slope (95% CI), Lethal Time for 50 and 95% (LT_{50–95} in days), Biting Inhibition Time 50 and 95% (BIT_{50–95} in days).

Insecticide/repellent	Mortality						Blood Feeding Inhibition					
	slope	(95%CI)	LT ₅₀	(95%CI)	LT ₉₅	(95%CI)	slope	(95%CI)	BIT ₅₀	(95%CI)	BIT ₉₅	(95%CI)
PM	-2.29 ^{ab}	± 0.64	19.67 ^a	± 2.97	5.46 ^{ab}	± 2.14	-1.33 ^a	± 0.59	25.46 ^a	± 9.33	2.80 ^a	± 2.93
DEET	-1.46 ^a	± 0.40	20.91 ^{ac}	± 4.75	2.79 ^a	± 1.68	-2.04 ^a	± 0.78	24.38 ^a	± 5.27	5.79 ^a	± 3.44
KBR	-3.04 ^b	± 0.98	24.79 ^{ac}	± 3.19	9.43 ^b	± 3.17	-2.06 ^a	± 0.81	33.51 ^a	± 7.39	8.03 ^a	± 4.84
PM+DEET	-4.81 ^c	± 0.92	161.03 ^b	± 6.63	87.32 ^c	± 10.84	-3.18 ^a	± 0.90	94.34 ^b	± 7.99	37.44 ^b	± 10.29
PM+DEET expected	-1.37 ^a	± 0.44	31.14 ^c	± 7.56	3.65 ^{ab}	± 2.66	-1.57 ^b	± 0.60	52.46 ^c	± 12.04	8.09 ^a	± 6.11
PM+KBR	-4.79 ^c	± 0.96	135.39 ^b	± 5.22	73.30 ^c	± 9.48	-2.40 ^a	± 0.67	71.42 ^c	± 8.10	21.04 ^{bc}	± 7.54
PM+KBR expected	-1.70 ^{ab}	± 0.54	30.45 ^c	± 6.57	5.41 ^{ab}	± 3.19	-1.74 ^b	± 0.59	58.09 ^c	± 10.72	10.79 ^{ac}	± 6.45

Numbers in the same line sharing the same superscript letter do not differ significantly (Confidence Intervals are overlapping)

Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CP carried out the laboratory evaluation, analyzed and interpreted data and drafted the manuscript. VC substantially helped draft the manuscript. PB and AO helped to carry out the laboratory evaluation. RN helped draft the manuscript. BL participated to design the study. JMH designed the study, interpreted the data and helped draft the manuscript.

Acknowledgements

We are very grateful to Osler Company for providing repellent formulations. This study was financially supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR) and Osler Company.

References

- Zaim M, Aitio A, Nakashima N: **Safety of pyrethroid-treated mosquito nets.** *Med Vet Entomol* 2000, **14**:1-5.
- Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, Mouchet J, Guillet P: **Status of pyrethroid resistance in Anopheles gambiae sensu lato.** *Bull World Health Organ* 1999, **77**:230-234.
- Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M: **Anopheles funestus resistant to pyrethroid insecticides in South Africa.** *Medical and Veterinary Entomology* 2000, **14**:181-189.
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH: **Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan Anopheles gambiae associated with resistance to DDT and pyrethroids.** *Insect Molecular Biology* 2000, **9**:491-497.
- Etang J, Fondjo E, Chandre F, Morlais I, Brengues C, Nwane P, Chouai-bou M, Ndjemai H, Simard F: **First report of knockdown mutations in the malaria vector Anopheles gambiae from Cameroon.** *Am J Trop Med Hyg* 2006, **74**:795-797.
- Fanello C, Kolaczinski JH, Conway DJ, Carnevale P, Curtis CF: **The kdr pyrethroid resistance gene in Anopheles gambiae: tests of non-pyrethroid insecticides and a new detection method for the gene.** *Parassitologia* 1999, **41**:323-326.
- N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M: **Pyrethroid treated nets and indoor residual spraying may no longer be effective against Anopheles gambiae in an area of pyrethroid resistance in Benin, West Africa.** *Emerging Infectious Diseases* 2007, in press.
- Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbeto M, Lardeux F, Hougaard JM, Guillet P: **Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of Anopheles gambiae and the selection of pyrethroid resistance.** *Malar J* 2004, **3**:22.
- Darriet F, Guillet P, N'Guessan R, Doanno JM, Koffi A, Konan LY, Carnevale P: **[Impact of resistance of Anopheles gambiae s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets].** *Med Trop (Mars)* 1998, **58**:349-354.
- Darriet F, N'guessan R, Koffi AA, Konan L, Doanno JMC, Chandre F, Carnevale P: **Impact of the resistance to pyrethroids on the efficacy of impregnated bednets used as a means of prevention against malaria: results of the evaluation carried out with deltamethrin SC in experimental huts.** *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* 2000, **93**:131-134.
- Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, Guillet P: **Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in Anopheles gambiae.** *Medical and Veterinary Entomology* 2000, **14**:81-88.
- Henry MC, Assi SB, Rogier C, Dossou-Yovo J, Chandre F, Guillet P, Carnevale P: **Protective efficacy of lambda-cyhalothrin treated nets in Anopheles gambiae pyrethroid resistance areas of Cote d'Ivoire.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **73**:859-864.
- Guillet P, N'Guessan R, Darriet F, Traore-Lamizana M, Chandre F, Carnevale P: **Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus.** *Med Vet Entomol* 2001, **15**:105-112.
- Zaim M, Guillet P: **Alternative insecticides: an urgent need.** *Trends Parasitol* 2002, **18**:161-163.
- Corbel V, Hougaard JM, N'Guessan R, Chandre F: **Evidence for selection of insecticide resistance due to insensitive acetyl-cholinesterase by carbamate-treated nets in Anopheles gambiae s.s. (Diptera: Culicidae) from Cote d'Ivoire.** *J Med Entomol* 2003, **40**:985-988.
- Rowland M, Downey G, Rab A, Freeman T, Mohammad N, Rehman H, Durrani N, Reyburn H, Curtis C, Lines J, Fayaz M: **DEET mosquito repellent provides personal protection against malaria: a household randomized trial in an Afghan refugee camp in Pakistan.** *Trop Med Int Health* 2004, **9**:335-342.
- Rowland M, Freeman T, Downey G, Hadi A, Saeed M: **DEET mosquito repellent sold through social marketing provides personal protection against malaria in an area of all-night mosquito biting and partial coverage of insecticide-treated nets: a case-control study of effectiveness.** *Trop Med Int Health* 2004, **9**:343-350.
- Costantini C, Badolo A, Ilboudo-Sanogo E: **Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against Anopheles gambiae complex and other Afrotropical vector mosquitoes.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004, **98**:644-652.
- Barnard DR, Bernier UR, Posey KH, Xue RD: **Repellency of IR3535, KBR3023, para-menthane-3,8-diol, and deet to black salt marsh mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Everglades National Park.** *J Med Entomol* 2002, **39**:895-899.
- Badolo A, Ilboudo-Sanogo E, Ouedraogo AP, Costantini C: **Evaluation of the sensitivity of Aedes aegypti and Anopheles gambiae complex mosquitoes to two insect repellents: DEET and KBR 3023.** *Trop Med Int Health* 2004, **9**:330-334.
- Schreck CE, Kline DL, Smith D: **Protection afforded by the insect repellent jacket against four species of biting midge (Diptera: Ceratopogonidae).** *Mosquito News* 1979, **39**:739-742.
- Smith CN, Burnett D: **Laboratory evaluation of repellents and toxicants as clothing treatments for personal protection from flies and ticks.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1948, **28**:599-607.
- N'Guessan R, Rowland M, Traore Lamizana M, Kesse NB, Carnevale P: **Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus mosquitoes.** *Trop Med Int Health* 2006 in press.
- Deparis X Frere, B., Lamizana, M., N'Guessan, R., Leroux, F., Lefevre, P., Finot, L., Hougaard, J.-M., Carnevale, P., Guillet, P., Baudon, D.: **Efficacy of Permethrin-treated Uniforms in Combinations in Combination with DEET Topical Repellent for Protection of French Military Troops in Côte d'Ivoire.** *Journal of Medical Entomology* 2004, **41**:914-921.
- Pennetier C, Corbel V, Hougaard JM: **Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:739-744.
- Bio-Log, Scientific, Software: **GOSA® software.** wwwbio-logbiz [http://www.bio-log.biz].
- Bliss CL: **The toxicity of poisons applied jointly.** *Annals of Applied Biology* 1939, **26**:585-615.
- Xue RD, Barnard DR, Ali A: **Laboratory and field evaluation of insect repellents as larvicides against the mosquitoes Aedes albopictus and Anopheles albimanus.** *Medical and Veterinary Entomology* 2001, **15**:374-380.
- Xue RD, Ali A, Barnard DR: **Laboratory evaluation of toxicity of 16 insect repellents in aerosol sprays to adult mosquitoes.** *J Am Mosq Control Assoc* 2003, **19**:271-274.
- Licciardi S, Herve JP, Darriet F, Hougaard JM, Corbel V: **Toxicity and irritancy of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) against Aedes aegypti mosquitoes.** *Med Vet Ent* 2006 in press.
- Pennetier C, Corbel V, Lapiel B, Hougaard JM: **Combining insecticide and repellent to control malaria vector, a promising strategy.: 14-18 Novembre 2005; Yaoundé, Cameroon.** ; 2005.

32. Lapiéd B, Pennetier C, Stankiewicz M, Gautier H, Fournier D, Hougaard JM, Corbel V: **The insect repellent DEET exerts neuro-toxic effects through alterations of both neuronal function and synaptic transmission.: July 8-12; Vienna, Austria.** ; 2006.
33. Hougaard JM, Duchon S, Darriet F, Zaim M, Rogier C, Guillet P: **Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets.** *Bull World Health Organ* 2003, **81**:324-333.
34. Kolaczinski JH, Fanello C, Herve JP, Conway DJ, Carnevale P, Curtis CF: **Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance.** *Bull Entomol Res* 2000, **90**:125-132.
35. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, Raymond M: **The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors.** *Insect Mol Biol* 2004, **13**:1-7.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Article 3: article en préparation

***Synergy between repellents and Organophosphates on bed nets:
Impact on nets' efficacy and behaviour of natural free-flying
resistant An. gambiae mosquitoes in Burkina Faso.***

Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapiéd B, Chandre F & Hougard JM.

**Synergy between repellents and Organophosphates on bed nets:
Impact on nets' efficacy and behaviour of natural free-flying resistant *An. gambiae*
mosquitoes in Burkina Faso.**

Cédric Pennetier¹, Carlo Costantini², Vincent Corbel³, Séverine Licciardi¹, Roch K. Dabiré⁴, Bruno Lapiéd⁵, Fabrice Chandre¹ and Jean-Marc Hougard¹

¹ Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Bénin

² Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso

³ Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France

⁴ Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso

⁵ Laboratoire RCIM, Université d'Angers, Angers, France

Abstract

Chemicals are used on bed nets in order to prevent infected bites and to kill aggressive malaria vectors. Because pyrethroid resistance has become widespread in the main malaria vectors, research for alternative active ingredients became urgent. Mixing a repellent and a non-pyrethroid insecticide seemed to be a promising tool as mixtures in the laboratory showed same features as pyrethroids. We present here the results of two trials run against free-flying *Anopheles gambiae* populations comparing the effects of two insect repellents (either DEET or KBR 3023, also known as icaridin) and an organophosphate insecticide at low-doses (pirimiphos-methyl, PM) used alone and in combination on bed nets. We showed that positive interactions between PM and the repellents induced higher exophily, blood feeding inhibition and mortality among susceptible and resistant malaria vectors that entered the hut, in contrast with the compounds when used alone for which behavioural modifications affected net efficacy. These field trials demonstrate the crucial role of behavioural modifications induced by chemicals used on bed nets and indicates that mixing repellents and organophosphates induced high levels of exophily, blood feeding inhibition and mortality against both susceptible and resistant free-flying mosquitoes.

Introduction

Malaria control aims to interrupt transmission, either by attacking the parasite in the human host, or by attacking the mosquito vector at its various stages. Usually a combination of methods, integrated to suit local conditions, needs and available resources is the most effective, but also the most difficult to apply. Malaria parasites are now extensively resistant to the majority of cheap and easy to use anti-malarial drugs [1]. The problem of drug resistance and the absence of a malaria vaccine available for use in the tropics in the near future, call for increased emphasis on vector control strategies in the control of malaria [2,3]. To efficiently control plasmodium transmission by vectors, 1) the mosquito vector and its host-seeking behaviour must be well characterised and 2) the impact on the vector behaviour of vector control strategies and chemicals must be well studied.

In Western Africa, the major vector of malaria is *Anopheles gambiae* Giles *sensu stricto*, which is known to be anthropophilic, endophagic and endophilic [4,5]. These characteristics are part of the reason that Insecticide treated nets (ITNs) are the mainstays of malaria vector control in these countries. Pyrethroids are recommended by the World Health Organization for bed net impregnation because they are effective at low dosages, fast acting, irritant and safe for humans [6]. Unfortunately pyrethroid resistance is widespread throughout Africa, especially with the target site mutation known as Knock down resistance (*Kdr*) [7,8,9,10,11]. Resistance mechanisms (i.e. *Kdr* and metabolic resistance mechanisms) might threaten sustainable vector control programs based on ITNs [12].

Recently, a new concept has been proposed: mixing a repellent and a non-pyrethroid insecticide on a net. Such mixtures showed similar features of pyrethroid, i.e. the lethal effect, knock-down effect and irritancy against susceptible and pyrethroid-resistant mosquitoes [13,14]. Two combinations (using pirimiphos methyl (PM), an organophosphate, and two repellents, diethyl-m-toluamide (DEET) and KBR 3023 also known as icaridin) were chosen to be tested in the field. Pennetier *et al* [15] found that the bed nets treated with the two mixtures were as effective as deltamethrin against susceptible mosquitoes, and more effective in killing *Anopheles gambiae* carrying *Kdr* or *Ace.1^R* resistance genes. Moreover the mixtures did not select for either the *Kdr* or the *Ace.1^R* alleles indicating that Repellent/Insecticide Treated Nets (RITNs) could be used to control insecticide-resistant malaria vectors[15].

The key factors in this promising strategy are quite volatile compounds, the repellents. As emphasized by Grieco *et al.* [16], chemicals cannot be classified based solely on their killing effect. They can disrupt contact between humans and malaria-transmitting mosquitoes not only by killing the mosquitoes. Indeed, the first host cues to reach a mosquito are (after carbon dioxide) volatile chemicals emanating from the skin, breath and waste products of a potential host, carried by air currents. The probability that the mosquito responds to these cues and the strength of the response depend on the strength of the host-derived stimuli, the strength of competing external stimuli (e.g. odours from other sources, prohibitive wind speeds, etc.), the internal state of the mosquito (e.g. circadian phase, gonotrophic status, etc.) and its

genotype (i.e. the genetic component of the responsiveness to given stimuli)[17]. ITNs constitute external stimuli sources because of chemicals on it, which are also released in their vicinity. *An. gambiae* behaviour in response to both human-derived stimuli and ITN stimuli is unknown, as is the behaviour in response to a physical barrier (untreated bed nets).

Usually, studies about ITNs efficacy evaluate the following parameters: deterrence, induced exophily, blood feeding inhibition and induced mortality. Using these indicators, we aimed to better understand the behavioural modifications and insecticidal efficacy induced by bed nets impregnated with PM/repellent mixtures and to investigate the involvement of the positive interactions between active compounds using experimental huts [18]. To do this, we compared the efficacies of the two mixtures with the compounds used alone on mosquito nets relative to an untreated net against free-flying malaria vectors in Burkina Faso, West Africa.

Methods

Study area

Vallée de Kou ($11^{\circ}24'N$; $04^{\circ}24'W$) is about 30 km north-west of Bobo-Dioulasso in the valley of the Kou River, a region where there has been extensive rice cultivation since the 1970s. This area contains 7 villages covering 7,200 ha surrounded by wooded savannah. As the Kou River flows all year round, it offers a permanent source of water for irrigation, hence allowing two crops of rice per year (July-November and January-May). The rice fields are highly productive permanent mosquito breeding sites, especially for the molecular form M of *Anopheles gambiae*. In rainy season additional anopheline breeding sites appear, such as depressions and rain puddles, where the molecular form S is more prevalent.

Repellents and insecticides

An organophosphate insecticide and two repellent products were evaluated singly and mixed on nets: "Pirigrain 250", a product produced by the company CGI (Compagnie Générale des Insecticides, France), is a formulation containing 25% Pyrimiphos methyl (PM); "DEET" is a formulation containing 30% diethyl-3-methylbenzamide (Deet); and "Icaridin®" or "Bayrepel®" is a formulation containing 25% KBR 3023, both produced by the company Osler, France. All three products were liquid (EC) formulations designed for clothing application. No other toxic or repellent chemicals other than those mentioned above were declared in the formulations.

Nets

Eight polyester nets of 100 denier netting and 156 mesh size were used in the study. To simulate the badly torn nets usually observed in African villages, 6 holes each measuring 4cm x 4cm were cut in the sides and ends of the nets according to WHO guidelines [18].

Experimental huts and mosquito collections

Experimental hut procedures and mosquito collections were carried out as per Darriet *et al.* [19]. Briefly, adult male volunteers slept in the huts on mats under the nets from 20:00 to 05:00 each night after cleaning the hut at 18:00 to remove any spiders or other predators. To minimise bias in individual attractiveness, sleepers and bed nets were rotated between huts on successive nights following a Latin square. Awaking at 05:00, the sleeper closed the windows, lowered the curtain separating the room from the verandah, and collected live and dead mosquitoes from the room, bed net, and veranda. Female mosquitoes were scored as dead or alive, fed or unfed, and identified to species. The trials ran for 27 nights over 4 weeks (May 5th to June 3rd and September 18th to October 14th, 2006).

The entomological impact of each treatment on mosquitoes was expressed relative to the control in terms of:

- Deterrence: the reduction in the number of mosquitoes found in a treated hut compared to the number in the control hut.
- Exophily: the proportion of mosquitoes found in the veranda of a treated hut compared with the proportion in the control hut.
- Blood feeding rate: the proportion of mosquitoes caught that were blood fed.
- Overall mortality rate: the proportion of mosquitoes found dead immediately (at time of collection) and after 24h to account for delayed mortality.

PCR detection of resistance alleles

Genomic DNA was extracted from field-collected mosquitoes and PCR amplified to determine the presence of the molecular forms M or S using the method of Favia *et al.*[20]. Samples of live and dead mosquitoes were taken from the control hut for detection of *kdr* and *Ace1^R* alleles in individual mosquitoes using respectively the methods of Martinez-Torrez *et al.* [7] and Weill *et al.* [21].

Statistical analysis

The response variable y was the number of dead mosquitoes collected every morning. The fraction of dead mosquitoes $p = y/n$ (where n is the total number of mosquitoes collected in the hut) was related to the time, the treatment of the bed net, the blood feeding rate $b = b_{fd}/n$, the exophily $q = exo/n$ and the season in a logistic regression model with the software GLIM v.4 [22]. The model assumed a binomial error distribution with regression parameters calculated by maximum likelihood. The statistical significance of main effects and interactions terms in the model was tested by F-tests in an analysis of the deviance (ANODEV) by looking at the change in deviance caused by the removal of each term from the maximal model after having allowed for over dispersion in the data by calculating heterogeneity coefficients with the Williams algorithm [23,24]. Exophily and blood feeding rates were analysed following the same maximum likelihood procedures in GLIM v.4 software. Numbers of mosquitoes entered in the huts were related to time (days). The model assumed a poisson error distribution with regression parameters also calculated by maximum likelihood using GLIM v.4 software.

Results

Vector population composition and insecticide resistance status

Molecular analysis revealed, as expected, a marked change between seasons in molecular form composition and insecticide resistance status (Table 1). During the dry season the molecular form S accounted for 5% of the *Anopheles gambiae* s.s. population, whereas at the end of the dry season it represented 85% of the sample. Accordingly, the *Kdr* allele, which confers resistance to pyrethroids, was found at a frequency of 8% in the *An. gambiae* s.s. sample during the dry season replicate and at 88% at the end of the rainy season. Similarly, the frequency of the *Ace1^R* allele, which confers resistance to organophosphates and carbamates, increased from 1% at the end of the dry season to 40% during the rainy season. The change in frequency of the insecticide resistance genes reflects the fact that these genes are found at high frequency only in the molecular form S of *An. gambiae*.

Deterrency

Analysis of the variance of the number of *An. gambiae* caught in huts with different treatments indicated that the only statistically lower density in treated huts occurred during the first week. Entry rates were significantly lower from the control for both KBR and PM+KBR treatments (95% confidence intervals did not overlap 0) (fig 1c & 1e). PM, DEET and PM+DEET did not induce any differences from the control in terms of the *An. gambiae* entry rate during the 4 weeks (95% CI overlapped 0) (fig 1a, 1b, 1d). Note that significantly more mosquitoes entered in huts where there were PM and PM+KBR treated nets during the 3rd week, indicating an attractive effect of these bed nets (fig 1c & 1e).

Exophily

In the minimal adequate model for the exophily data, there was no difference between the control, PM and the two repellents used alone (fig 2a). Exophily induced by the two mixtures was higher than the control and compounds used alone (fig 2a) ($t=6.83$; $p<0.005$). The same trend was observed in rainy season but populations of *An. gambiae* seemed to be more exophilic in dry season ($t=4.71$; $p<0.005$) (fig 2b).

Blood feeding

Blood feeding rates were constant during the 2 trials in the control huts. In dry season, it was higher (88%) than in rainy season (81%) ($t=3.73$; $p<0.05$). In the minimal adequate model for the blood feeding data, there is no difference between PM and the two repellents used alone and between the 2 mixtures, PM+DEET and PM+KBR (fig 3a & 3b). However, the mixtures inhibited significantly more blood feeding than the repellent compounds used alone ($t=7.70$; $p<0.005$) (fig 3a & 3b).

Mortality

The model that best fit the data took into account the main effects treatment and time and their interaction with the season (additional file). Exophily and blood feeding explain a significant part of the deviance of the mortality data depending on the treatment (respectively $f=17.05$; $p=0.043$ and $f=16.59$; $p=0.047$). The blood feeding explained a significant part of the deviance in the mortality induced by PM ($t=4.68$; $p<0.005$) and DEET ($t=3.52$; $p<0.05$), but not for KBR and the two mixtures PM+DEET and PM+KBR. For PM and DEET, the mortality rate was negatively correlated with the blood-feeding rate. Exophily explained a significant part of the deviance of mortality induced by PM ($t=3.49$; $p<0.05$), DEET ($t=2.01$; $p<0.05$) and PM+DEET ($t=2.4$; $p<0.05$). For PM and PM+DEET, the exophily was negatively correlated with the mortality rate. In contrast, with DEET treated net, the exophily was positively correlated with the mortality rate. All the treatments differed significantly from each other and decreased with time during the trials (fig 4). At the beginning of the dry season trial, KBR was killing less than 20% of exposed mosquitoes, PM less than 30% and DEET less than 50%. In contrast at the same time, PM+DEET was killing 93% of mosquitoes that entered in the hut and PM+KBR about 99% (Figure 4A).

In the rainy season, the mortality at the beginning of the trial was significantly lower for PM and DEET used alone but not for KBR used alone. The mortality induced by PM+DEET did not decrease significantly in the rainy season ($t=0.98$; $p>0.05$), in contrast with PM+KBR ($t=4.32$; $p<0.005$). Moreover the maximal efficacy did not last as long as it did in dry season (fig 4a & 4b).

The differences observed between the mixtures and compounds used alone are characteristic of their interactions. Positive interactions were greater between PM and KBR than between PM and DEET.

Synergy amplitude was affected by the season change for PM+KBR ($t=4.32$; $p<0.01$) but not for PM+DEET ($t=0.97$; $p>0.05$).

Discussion

Many field studies have been run with insecticide mixtures for which synergistic interactions have been observed in laboratory [25,26,27]. But none of these showed evidence of synergistic interactions in field conditions. Our results showed for the first time synergism in natural conditions against wild populations of the main malaria vector, *An. gambiae*. This synergy occurred between PM and the two repellents DEET and KBR, as previously demonstrated [14]. Moreover, the two mixtures PM+DEET and PM+KBR were still efficient against *An. gambiae* populations that shared the *Ace1^R* and *Kdr* resistance genes at high levels (*Ace1^R* freq = 0.40; *Kdr* freq = 0.88). Another study evaluated the efficacy of these kind of mixtures compared with conventional pyrethroid-treated nets and their impact on resistance gene selection, especially *Ace1^R* and *Kdr* [15]. Observations on this new strategy of resistant malaria vector control focused on the short residual effect of the repellents and these comments are justified [28]. However, companies are now working to develop long-lasting repellent formulations. For example, a micro-encapsulated formulation (MC) of DEET showed residual efficacy for up to six months in laboratory conditions [29,30]. Moreover, other DEET formulations are currently being evaluated in laboratory conditions and are showing the same efficiency one year after application on nets (Pennetier *et al*, unpublished data). So, it is not unrealistic to imagine that long-lasting repellent formulations will be available in the next few years.

Blood feeding and exophily behaviour explained a part of the variability of the mortality of *An. gambiae* for the compounds when used alone, but not for the mixtures, indicating that the efficacy of the mixtures was not dependent on the mosquito behaviour in the experimental huts. It seems to be a positive indicator that this vector control tool was not dependent on the behaviour of mosquitoes that entered the huts. Behavioural modifications observed in dwellings with PM, DEET or KBR mono-treated nets may be involved positively or negatively in insecticidal efficacies. The question of mosquito host-seeking behaviour in the presence of a physical barrier (bed net) or chemical (repellent on skin, ITNs, or volatile compounds in dwellings) is consequently crucial. Many fundamental studies have focussed on free host seeking behaviour (i.e. without any chemical or control tool) but there is a lack of knowledge about the behavioural accommodations of mosquitoes in the presence of treated materials as has been done for behaviour responses of Tsetse flies (*Glossina ssp*) to a vector control tool like insecticide treated cattle [31], in order to improve the control strategies of Human African Trypanosomiasis (HAT) [32].

Here, the objective was to better understand the impact of interactions between PM and the two repellents, DEET and KBR 3023 so we used quite low dosages. It would be interesting to study behavioural modifications and the insecticidal effect of PM and the two repellents at higher dosages to investigate the potentialities of using these compounds alone on bed nets [33]. Investigations on

repellents are all the more important as we showed that the same chemical (KBR 3023) could be repellent or attractant according to its concentration, as has already been demonstrated for DEET [34].

Nevertheless, chemicals are only external stimuli added to human cues. Our results also showed a significant effect of the season on different indicators, *An. gambiae* populations in the rainy season were significantly less exophilic and significantly less aggressive than in the dry season. There are too many differences between these two populations (genetic background, meteorological conditions) to hypothesize about the cause. But this indicates that there might be differences in host-seeking behaviour between the M&S molecular forms, between mosquitoes that are sharing different insecticide resistance genes, between mosquitoes with different parasitic status, or with different ecological or meteorological preferences. This information can lead us to improve the protocol of experimental hut trials, especially by including more variables (for example, parasitic status or meteorological data), and using a general model to take in account the impact of all these variables on the efficacy of different treatments. Standard protocols and new classifications proposed by Grieco et al.[16] should be the first step toward the establishment of general methods to evaluate new chemical proposed for malaria vector control.

In conclusion, our results showed a potential tool to manage resistant *An. gambiae*. Mixing OPs and repellents offered excito-repellency and mortality as required for protecting the sleeper and the community based on the positive interaction of the 2 chemicals. This concept will have practical potentialities for malaria control when long-lasting formulations of repellent are available. Generally, this study focused on the need to improve knowledge about mosquito vector host-seeking behaviour, particularly when treated materials are used.

Legends

Figure 1: Log of the difference between numbers of mosquitoes entering treated hut and the control one, with 95% confidence intervals. Axis of abscissa represents the week numbers after the beginning of the trial.

Figure 2: Exophily rates over time in the minimal adequate logistic regression model. A) Trial during dry season 2006; B) Trial during rainy season 2006

Figure 3: Blood feeding rates over time in the minimal adequate logistic regression model. A) Trial during dry season 2006; B) Trial during rainy season 2006

Figure 4: Mortality rates over time in the minimal adequate logistic regression model. A) Trial during dry season 2006; B) Trial during rainy season 2006

Table 1: Frequency of the S molecular form of *An. gambiae*, of Knock Down Resistance (*Kdr*) allele and insensitive acetylcholinesterase (*Ace.1^R*) allele. Samples have been randomly taken in the control hut.

Acknowledgments

We sincerely thank the team of VK7 for their excellence during field work, and the people of VK7 for their hospitality. Many thanks to Seth Irish who provided helpful comments. This study was financially supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR, program REACT n° 2006 SEST 030 01) and Osler Company (Melun, France). CP was supported by Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de Cotonou (Volontaire International fellowship) and François Lacoste and the Fondation de France (Student fellowship).

References

1. Peters W (1990) Plasmodium: resistance to antimalarial drugs. Ann Parasitol Hum Comp 65 Suppl 1: 103-106.
2. WHO (2005) The world malaria report 2005. Geneva, World Health Organization: Available: <http://rbm.who.int/wmr2005/>.
3. Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA (2005) Malaria. Lancet 365: 1487-1498.
4. Costantini C, Gibson G, Sagnon N, Della Torre A, Brady J, et al. (1996) Mosquito responses to carbon dioxide in a west African Sudan savanna village. Med Vet Entomol 10: 220-227.
5. Costantini C, Sagnon NF, della Torre A, Diallo M, Brady J, et al. (1998) Odor-mediated host preferences of West African mosquitoes, with particular reference to malaria vectors. Am J Trop Med Hyg 58: 56-63.
6. Zaim M, Aitio A, Nakashima N (2000) Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. Med Vet Entomol 14: 1-5.
7. Martinez Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, et al. (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect Molecular Biology 7: 179-184.
8. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, et al. (1999) Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mofti form. Parassitologia 41: 319-322.
9. Chandre F, Darriet F, Manga L, Akogbeto M, Faye O, et al. (1999) Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. Bull World Health Organ 77: 230-234.
10. Diabate A, Baldet T, Chandre C, Dabire KR, Kengne P, et al. (2003) KDR mutation, a genetic marker to assess events of introgression between the molecular M and S forms of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) in the tropical savannah area of West Africa. J Med Entomol 40: 195-198.
11. Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabire KR, Hougard JM, et al. (2004) The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. Trop Med Int Health 9: 1267-1273.
12. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M (2007) Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. Emerging Infectious Diseases 13: 199-206.
13. Pennetier C, Corbel V, Hougard JM (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.
14. Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, et al. (2007) Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. Malar J 6: 38.
15. Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabire KR, et al. (2007) A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than pyrethroid against multi-locus resistant *Anopheles gambiae*. submitted.

16. Grieco JP, Achee NL, Chareonviriyaphap T, Suwonkerd W, Chauhan K, et al. (2007) A new classification system for the actions of IRS chemicals traditionally used for malaria control. PLoS ONE 2: e716.
17. Costantini C (1996) Odours for host-finding mosquitoes. Ciba Found Symp 200: 124-131.
18. WHO, editor (2006) Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs).
19. Darriet F, N'Guessan R, Hougard JM, Traore-Lamizana M, Carnevale P (2002) [An experimental tool essential for the evaluation of insecticides: the testing huts]. Bull Soc Pathol Exot 95: 299-303.
20. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C (2001) Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. Insect Molecular Biology 10: 19-23.
21. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, et al. (2004) The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. Insect Mol Biol 13: 1-7.
22. Payne C (1987) The GLIM system release 3.77 Manual. Numerical Algorithms Group Ltd, Oxford.
23. Collett D (1991) Modelling Binary Data. Chapman & Hall/CRC, London.
24. Crawley M (1993) GLIM for Ecologists. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
25. Hougard JM, Corbel V, N'Guessan R, Darriet F, Chandre F, et al. (2003) Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Côte d'Ivoire. Bull Entomol Res 93: 491-498.
26. Guillet P, N'Guessan R, Darriet F, Traore-Lamizana M, Chandre F, et al. (2001) Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. Med Vet Entomol 15: 105-112.
27. Asidi AN, N'Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, et al. (2005) Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-methyl) or a pyrethroid (lambda-cyhalothrin) alone and in combination against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. Malar J 4: 25.
28. Killeen GF, Smith TA (2007) Exploring the contributions of bed nets, cattle, insecticides and excitorepellency to malaria control: a deterministic model of mosquito host-seeking behaviour and mortality. Trans R Soc Trop Med Hyg.
29. N'guessan R, Pennetier C, Knols B, Rowland M (2007) Deet microencapsulation: a slow release formulation for long-lasting treatment of bednets. Trans R Soc Trop Med Hyg.
30. N'Guessan R, Knols BJ, Pennetier C, Rowland M (2007) Deet microencapsulation: a slow release formulation for long-lasting treatment of bednets. Trans R Soc Trop Med Hyg.
31. Torr SJ, Hargrove JW, Vale GA (2005) Towards a rational policy for dealing with tsetse. Trends Parasitol 21: 537-541.
32. Torr SJ, Maudlin I, Vale GA (2007) Less is more: restricted application of insecticide to cattle to improve the cost and efficacy of tsetse control. Med Vet Entomol 21: 53-64.
33. N'Guessan R, Rowland M, Moumouni TL, Kesse NB, Carnevale P (2006) Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. Trans R Soc Trop Med Hyg 100: 1091-1097.
34. Mehr ZA, Rutledge LC, Buescher MD, Gupta RK, Zakaria MM (1990) Attraction of mosquitoes to diethyl methylbenzamide and ethyl hexanediol. J Am Mosq Control Assoc 6: 469-476.

Table 1

	S form frequency (n tested)	<i>Kdr</i> frequency (n tested)	<i>Ace1^R</i> frequency (n tested)
May-June (dry season)	0,05 (43)	0,08 (41)	0,01 (40)
September- October (rainy season)	0,85 (49)	0,88 (48)	0,40 (49)

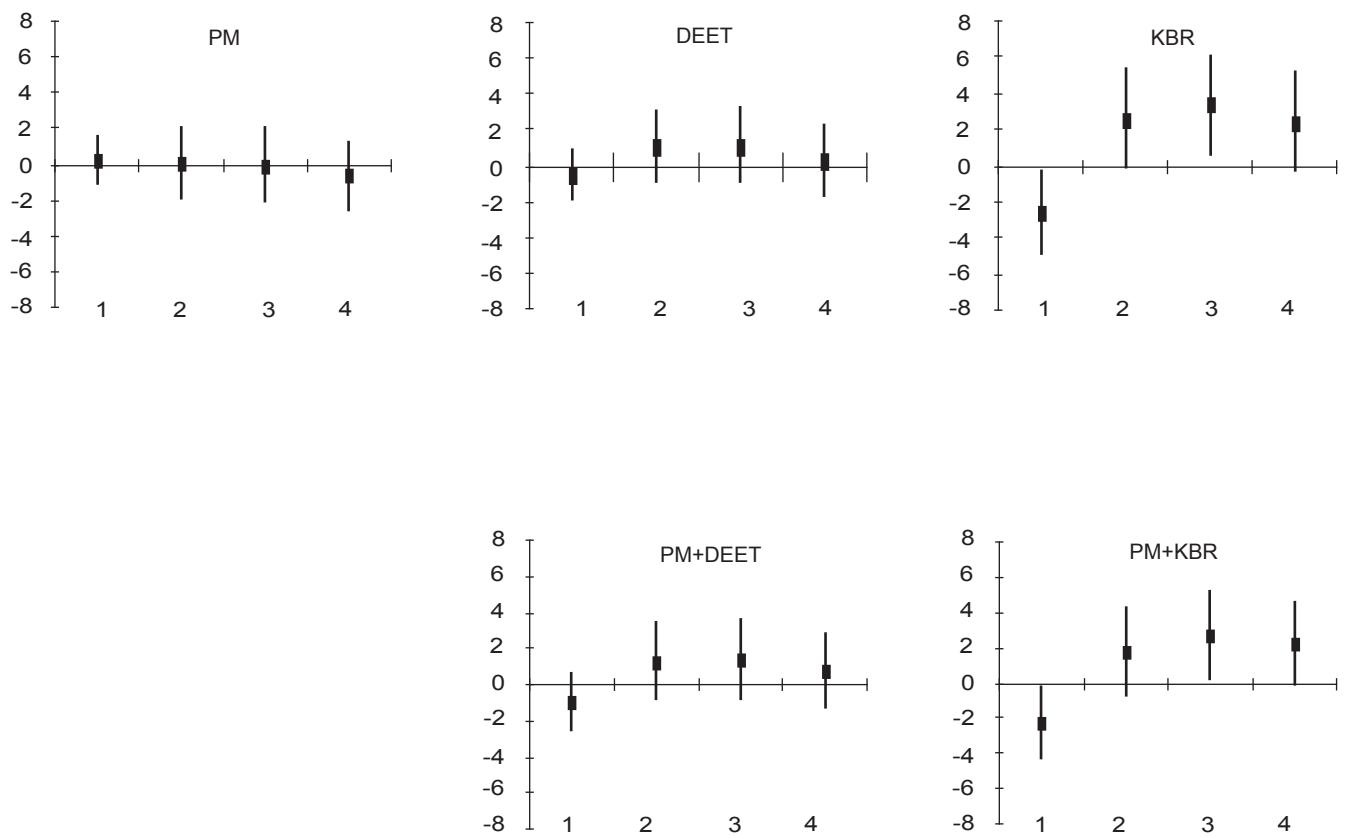


Figure 1

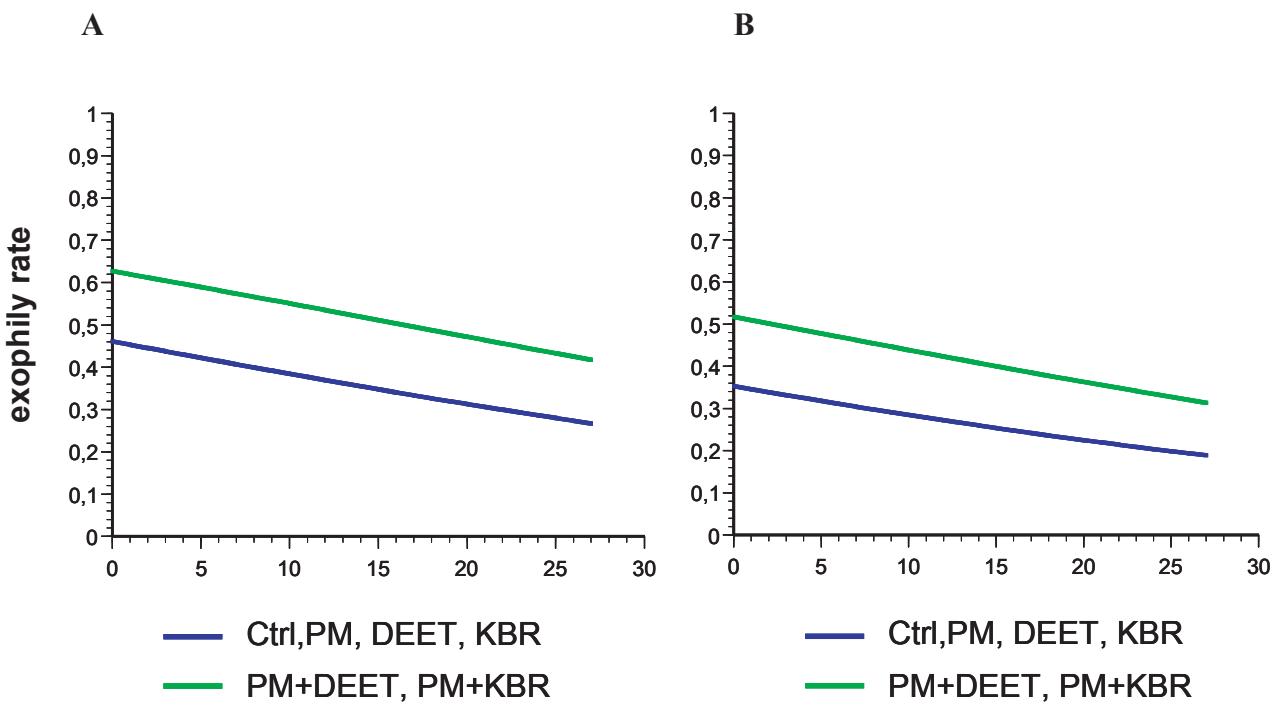


Figure 2

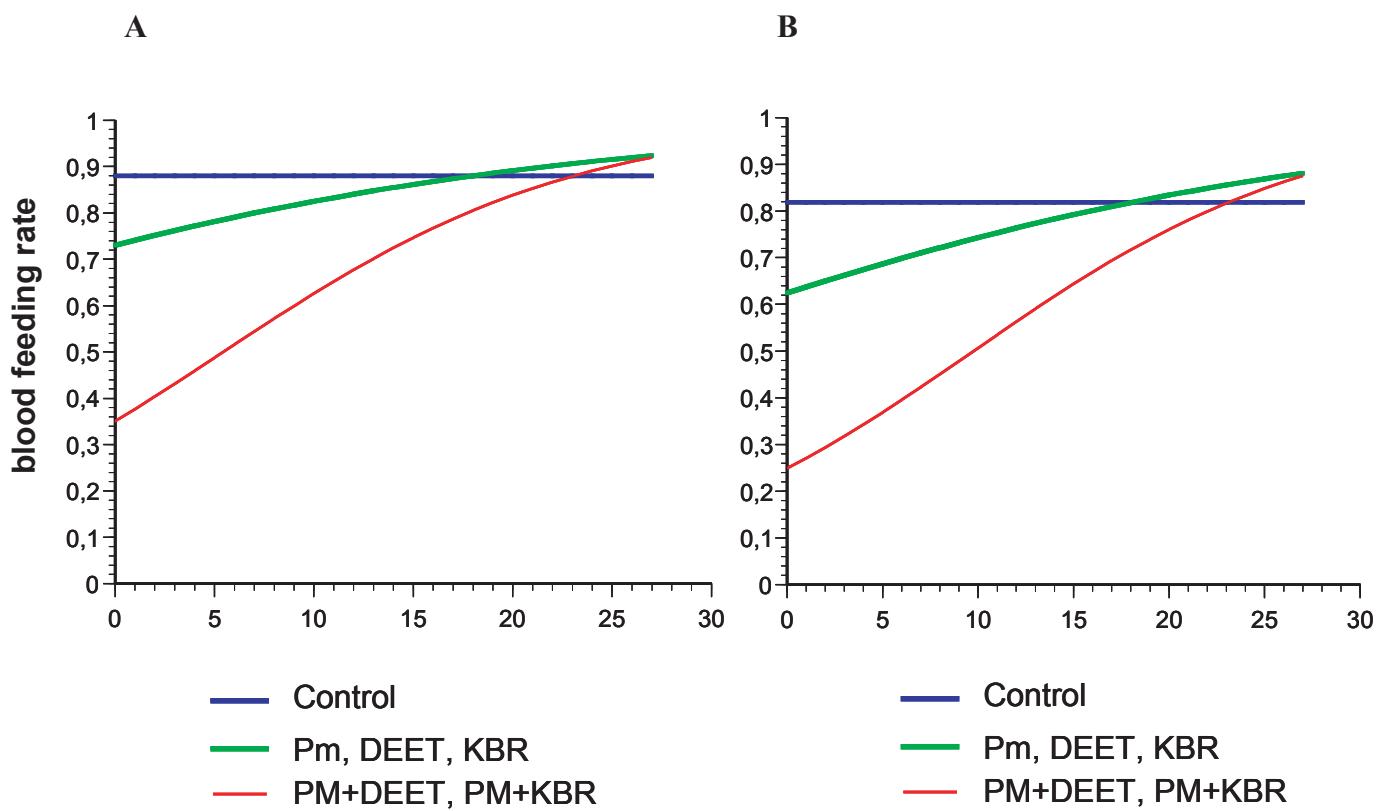


Figure 3

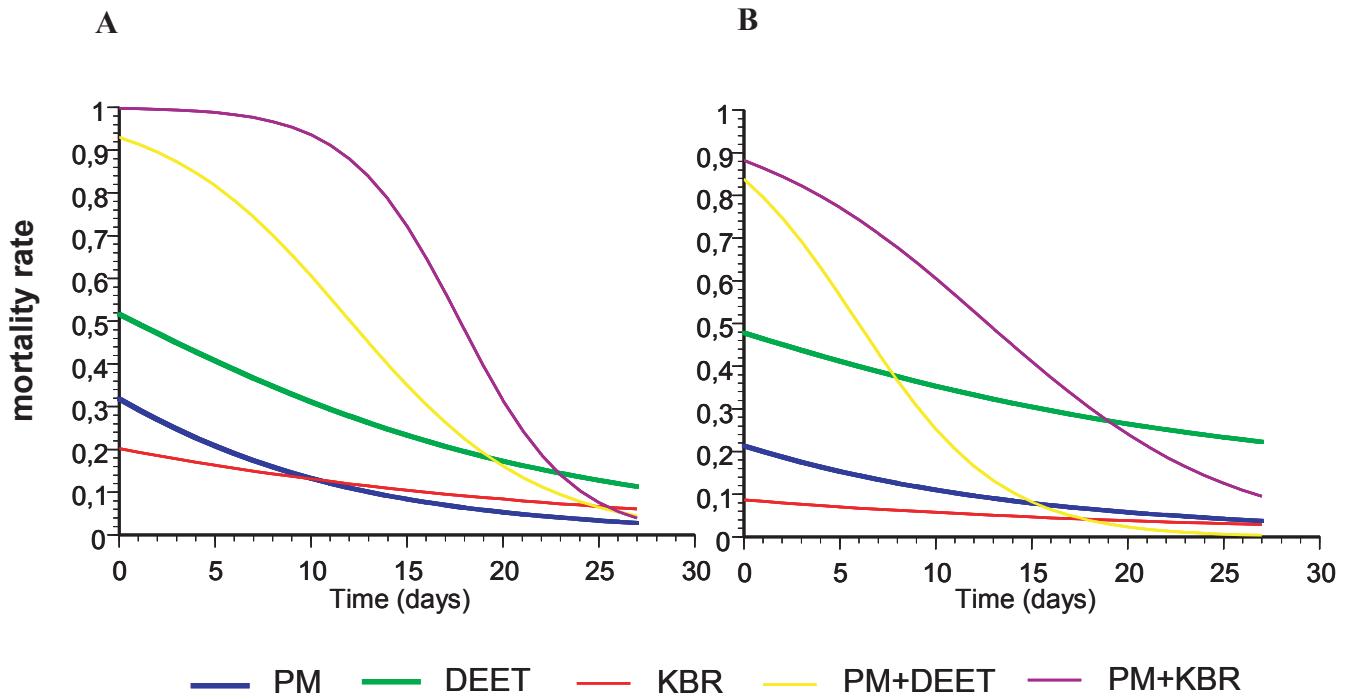


Figure 4

A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multi-locus resistant Anopheles gambiae

Pennetier C, Costantini C, Corbel V, Licciardi S, Dabiré RK, Lapiéd B, Chandre F & Hougard JM.

**EMERGING
INFECTIOUS DISEASES®**

**A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors:
low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on
mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multilocus
resistant *Anopheles gambiae***

Journal:	<i>Emerging Infectious Diseases</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Pennetier, Cédric; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 Costantini, Carlo; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 Corbel, Vincent; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 Licciardi, Séverine; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 Roch, DABIRE; Centre MURAZ, Entomology Lapiède, Bruno; Université d'Angers, RCIM, UPRES EA 2647 / USC INRA Chandre, Fabrice; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 Hougard, Jean-Marc; Institut de Recherche pour le Développement, UR016
Keywords:	malaria, <i>Anopheles gambiae</i> , bed nets, pyrethroid, resistance, repellents, insecticides, mixtures



December 3rd, 2007

Editor-in-Chief Emerging Infectious Diseases journal
National Center for Infectious Diseases
Centers for Disease Control and Prevention
Mailstop D-61
1600 Clifton Road
Atlanta, GA 30333
USA

Dear Editor,

You recently published a research article that alarmed the malaria control community about pyrethroid resistance in *An. gambiae* that appears to threaten the future of Long Lasting Insecticidal Nets (LLIN) and indoor residual spraying in Benin, West Africa (N'Guessan *et al.*, 2007). As mentioned in the conclusion of the article, "Use of LLIN should be encouraged but scale-up of treated nets may ultimately select for further resistance" and "the need to develop alternative insecticides to replace or supplement pyrethroids on nets is urgent ...".

Our research group in Benin is currently working on an alternative concept that consists of treating nets with a mixture of a non-pyrethroid insecticide and a repellent compound. Preliminary results under laboratory conditions were quite encouraging (Pennetier *et al.*, 2005 & 2007). We have the pleasure to submit to *Emerging Infectious Diseases journal* a manuscript entitled:" A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multilocus resistant *Anopheles gambiae*" autored by Cédric Pennetier, Carlo Costantini, Vincent Corbel, Séverine Licciardi, Roch K. Dabiré, Bruno Lapiéd, Fabrice Chandre and Jean-Marc Hougard.

You will find three attached files, one containing the text, one containing the four tables and another containing a figure.

Sincerely yours

Cédric Pennetier

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multilocus resistant *Anopheles gambiae*

Cédric Pennetier^{1*}, Carlo Costantini², Vincent Corbel³, Séverine Licciardi¹, Roch K. Dabiré⁴, Bruno Lapiéd⁵, Fabrice Chandre¹ and Jean-Marc Hougard¹

¹ Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Bénin

² Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso

³ Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France

⁴ Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS) / Centre Muraz, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso

⁵ Laboratoire RCIM, UPRES EA 2647 / USC INRA, Université d'Angers, Angers, France

*corresponding author

Abstract

The spread of resistance to pyrethroids in the major Afrotropical malaria vectors *Anopheles gambiae* s.s. urge the development of new strategies to control resistant mosquito populations. Impregnating mosquito nets with an insect repellent mixed with an organophosphorous insecticide at low-dosage could restore mortality of multilocus resistant *Anopheles gambiae* s.s. In experimental huts, we tested the efficacy of repellent-insecticide-treated nets (RITNs) against susceptible and insecticide resistant *Anopheles gambiae* populations in a rice-growing

area near Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. During the first two weeks post-treatment, RITNs nets were as effective as deltamethrin against susceptible mosquitoes, and more effective in killing *Anopheles gambiae* carrying *kdr* or *Ace.I^R* resistance genes. The mixtures did not select for either the *Kdr* or the *Ace.I^R* alleles. Our field trial indicates that mixing repellents and organophosphates on bed-nets could be used to control insecticide-resistant malaria vectors, provided improved residual activity of RITNs is achieved and safety is verified.

Keywords: malaria, *Anopheles gambiae*, bed nets, pyrethroid, resistance, repellents, insecticides, mixtures.

One sentence summary: Impregnating mosquito nets with an insect repellent mixed with an organophosphorous insecticide at low-dosage were as effective as standard impregnated net with deltamethrin against susceptible malaria vector mosquitoes, and more effective in killing *Anopheles gambiae* carrying insecticide resistance genes, without selecting for either the *Kdr* or the *Ace.I^R* alleles.

Introduction

Malaria remains one of the most significant causes of human mortality due to the high intensity of transmission in endemic areas, particularly sub-saharan Africa (1). Malaria transmission is expressed as the entomological inoculation rate (EIR), which reflects the degree of exposure of humans to pathogenic *Plasmodium* parasites. EIR is the product of 1) the infectiousness to mosquitoes of the human parasite reservoir, 2) the life-time transmission potential of individual mosquitoes, and 3) the rate at which they emerge from larval breeding sites –relative to the size of the human population (2). The predictor that have the largest impact on the success of integrated control programs of any of the three contributors to EIR, is the lifetime malaria transmission potential of individual mosquitoes (3). This illustrates

why a small decrease in vector populations survival can have a dramatic impact on EIR. This also explains the proven efficacy of insecticide-impregnated bed-nets (ITNs) or indoor residual house-spraying in achieving substantial reductions in malaria transmission (3). In view of the worldwide ban of DDT as the most suitable active ingredient for indoor residual spraying (4), ITNs remain the method of choice in malaria vector control as they are logically less demanding, and cheaper to implement on the ground(5).

Perhaps somehow even more significant is the effect that some classes of insecticides can have in deterring mosquitoes from entering and remaining inside dwellings, or inhibiting them from feeding upon humans. For example, at a site where the reported impact of impregnated bed-nets upon the survival of the vectors was low, and indeed statistically non-significant, a shift to feeding on animals (a 30% drop in the human blood index) and longer feeding cycles were observed (6). These effects do contribute to the reduction of the mosquito vectorial capacity, and can achieve significant reductions of the EIR by their own (7).

Pyrethroids possess properties that are essential in repelling and rapidly killing mosquitoes. They stimulate mosquitoes to fly away from treated surfaces upon contact (irritation effect), and they act fast (Knock-Down or KD effect). Moreover they are efficient at low dosages and especially safe for humans. Indeed, pyrethroids are to date the only class of insecticides that are recommended by the World Health Organization (WHO) and the Centers for Disease Control (CDC) for net impregnation (8, 9).

Unfortunately, resistance to pyrethroids in malaria vectors is becoming widespread across Africa with both metabolic resistance and target site modification induced by the knockdown resistance (*kdr*) gene mutations (10-13). It is somehow still uncertain whether spread of resistance genes will pose a serious threat to vector control programs based uniquely on pyrethroids. Some studies have shown that *kdr* resistance did not decrease the level of

protection conferred by ITNs and did not induce *Kdr* selection (14). Conversely, more recent studies have reported a fitness advantage for *Kdr* resistant phenotypes (15), and a decrease in the efficacy of ITNs in an area of pyrethroid resistance from Benin (16). It is becoming increasingly clear that alternative insecticidal molecules are needed. However fewer and fewer novel active ingredients become available, and the timeframe needed to satisfy the regulatory requirements of public health formulations is exceedingly long (17). The optimal use of existing compounds remains at present the only option for managing insecticide resistance in malaria vectors control. Two tactics have already been explored: i) the alternation of different classes of insecticides by rotation of active ingredients and mosaic treatments (18, 19), and ii) the use of insecticide mixtures (19, 20). Mixing a pyrethroid and an organophosphate provided encouraging results in laboratory assays, whereby synergism between the two active ingredients provided higher mortality against larval and adult mosquitoes at lower doses than those recommended for either ingredient alone (21-23). The interest of such a combination against pyrethroid-resistant vectors lies in the fact that mortality is restored by the organophosphate, and the favourable irritant and KD effects of the pyrethroid are still available. Bed-nets treated with a low-dose mixture of bifenthrin and carbosulfan were tested and mortality of pyrethroid-resistant *An. gambiae* compared to that achieved by recommended dosages of bifenthrin. Although the efficacy of mixtures did not differ significantly from that of either bifenthrin or carbosulfan used alone, the mixtures resulted advantageously more cost effective(19). The same trend was observed between lambda cyalothrin and chlorpyrifos-methyl (CM)(20).

The possibility to achieve both vector mortality and excito-repellency by optimal use of existing ingredients led us to test a new concept corresponding to the mixture of insect repellents with non-pyrethroid insecticides (24). The rationale behind this concept is to mimic with non-pyrethroid compounds the original features of pyrethroids i.e. both the lethality and

1
2
3 irritancy. Laboratory results showed that a combination of propoxur and DEET induced
4 irritancy, knockdown, and mortality as high as deltamethrin against a susceptible strain of
5 *Aedes aegypti*, and significantly higher mortality against a pyrethroid-resistant strain of this
6 mosquito. Such findings were mostly explained by a strong synergistic interaction (in terms of
7 mortality and KD effect) between DEET and propoxur (24). Similar synergism was also
8 observed in a test tunnel apparatus by mixing DEET or another insect repellent, i.e.
9 KBR 3023, with an organophosphate, i.e. Pirimiphos Methyl (PM), on mosquito nets baited
10 with guinea pigs (25). These studies constitute a first step towards the development of an
11 alternative strategy based on insect repellents for malaria vectors control in areas of
12 pyrethroid resistance.

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28 In this study we present results of the first evaluation of this new strategy under field
29 conditions. The objective of the trial was to compare the efficacy of mosquito nets
30 impregnated with mixtures of DEET + PM or KBR 3023 + PM (hereafter repellent +
31 insecticide treated-nets, or RITNs) with respect to bed-nets treated with a standard
32 formulation of a pyrethroid, i.e. deltamethrin. The field trial was carried out in an area where
33 *Anopheles gambiae* s.s. populations are both susceptible or resistant to pyrethroids,
34 organophosphates and carbamates depending on the season, due to temporal fluctuations in
35 the relative frequency of the two molecular forms of *An. gambiae*, M and S, which in this area
36 carry insecticide resistant alleles at contrasting frequencies (10, 11). In particular, the S-form
37 carries the knockdown resistant (*Kdr*) and the insensitive acetylcholine esterase (*AcE1^R*)
38 alleles at high frequency, whereas these alleles float at much lower frequency in the M-form.
39
40 In this paper we present the response of the vector populations to the lethal effect of the
41 formulations tested. A detailed account of the behavioural effects of the repellent + insecticide
42 mixtures is presented in a companion paper. Moreover, we investigated under laboratory
43 conditions, whether RITNs could select for the insecticide resistance genes.

Methods*Study area*

The field trial was carried out in the village of VK7, in the valley of the Kou river near Bobo-Dioulasso, south-western Burkina Faso. The area is exploited by farmers for large-scale cultivation of rice. Rice paddies provide extensive sites for mosquito breeding throughout most of the year, particularly for the molecular form M of *Anopheles gambiae* s.s. Conversely, the molecular form S of this malaria vector appears mainly during the wet season, as it breeds mostly in puddles created by rains, and other rain-dependent larval habitats.

Repellent and insecticide formulations

An organophosphate insecticide and two repellent formulations were evaluated as mixtures impregnated on mosquito nets: *Pirigrain 250*, is an emulsifiable concentrate (EC) formulation containing 25% Pirimiphos Methyl (PM) produced by CGI (*Compagnie Générale des Insecticides*, Cergy Pontoise, France). KBR 3023 (hydroxyethyl isobutyl piperidine carboxyilate, also known as icaridin) was formulated as a liquid concentrate containing 25% of active ingredient. DEET (diethyl-3-methylbenzamide) was also formulated as a liquid concentrate containing 30% of active ingredient. The two repellent formulations are designed and distributed for application on clothing by the company *Osler* (Melun, France).

Deltamethrin was our pyrethroid of choice because it is one of the two gold standard pyrethroid used for net impregnation with permethrin; it has a good toxicology profile and has undergone the WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES). A standard suspension concentrate at 20% (KO-Thrin[®], Bayer Crop Science, Monheim am Rhein, Germany), which

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
is routinely used to impregnated bed-nets was used in the trial. No toxic or repellent
chemicals other than those mentioned above were declared in the formulations tested.

11
Mosquito nets and treatments

12
13 We used polyester nets of 100 denier netting and 156 mesh size. To simulate the conditions of
14 bed-net wear and tear that can be encountered in the field, six holes, each measuring 4 x 4 cm,
15 were cut on the sides and ends of each net. The nets were impregnated with the repellent
16 DEET or KBR 3023 at a dose of 10 g/m² and the insecticide PM at a dose of 150 mg/m² and a
17 control treatment with a standard pyrethroid deltamethrin at a dose of 25 mg/m² by dipping.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

50
Experimental huts and mosquito collections

51 The treated nets were set inside 4 experimental huts, following the same design and
52 procedures described in Darriet *et al.* (26) and N'Guessan *et al.* (27). Briefly, the huts are
53 3.5 x 2 x 2 m and built with local materials so that mosquitoes can fly only through four entry
54 baffles that hinder them to escape from the hut once inside. In this way the majority of
55 mosquitoes entering the hut can be accounted for. A veranda-trap made of polyethylene
56 sheeting and mesh screening measuring 2 m long, 1.5 m wide, and 1.5 m high, projects from
57 the back wall of each hut. Movement of mosquitoes to and fro the huts and the verandas was
58 unimpeded during the night. Each experimental hut rests on a concrete base surrounded by a
59 water-filled moat to prevent entry of ants that would otherwise eat mosquitoes knocked down
60 on the floor of the hut.

51 Local adult male volunteers recruited for the study slept on mats under the nets from 20:00 to
52 05:00; at 18:00, before the start of the tests, they removed spiders and other mosquito
53 predators. At 05:00, the volunteers closed the entry baffles, lowered the curtain separating the
54 sleeping room from the veranda-trap, and collected all mosquitoes from the room, bed-net,

and veranda, whether dead or alive. Female mosquitoes were scored by location as dead or alive, fed or unfed, and identified to morpho-species. To minimise bias in individual attractiveness and spatial variation in mosquito densities, the sleepers and bed-nets were rotated between huts. Two replicates of the trial, each running for 27 nights over 4 weeks, were carried out: the first at the end of the dry season (May 5th to June 3rd), when mainly the molecular form M of *An. gambiae* is present in the village; the second at the end of the rainy season (September 18th to October 14th), when the form S constitute the majority of the *An. gambiae* population.

Ethical issues

Informed consent was obtained from the human volunteers prior to enrolling them in the study. Malaria chemoprophylaxis and medical surveillance was provided them during and 3 weeks after the trial. The IRD and Burkina Faso national ethical committees issued formal ethical approval of the protocol.

Molecular analyses

To determine the presence and relative frequency of the molecular forms M and S of *An. gambiae* s.s., genomic DNA of field-collected mosquitoes was extracted and amplified by PCR according to the method of Favia *et al.* (28). Samples of mosquitoes that were alive or dead at the time of collection were taken from the control hut for molecular detection in individual mosquitoes of the *Kdr* and *Ace1^R* alleles using the methods of Martinez-Torrez *et al.* (29) and Weill *et al.* (30), respectively.

Statistical analysis

The entomological impact of each treatment on mosquitoes was expressed relative to the control in terms of the overall mortality rate; this is the proportion of mosquitoes that were found dead at the time of collection, and those that died after having held them during 24 h post-exposure. We considered that the mortality rate is the response expected to have the most significant epidemiological impact. For statistical purposes, we fitted a logistic regression model assuming a binomial error distribution with regression parameters calculated by maximum likelihood with the software GLIM v.4 (31); we used the number of dead mosquitoes y as response variable, and the total number n of mosquitoes collected in the hut as binomial denominator. The proportion of dead mosquitoes $p = y/n$ was related to the time (in days) post-treatment, the insecticidal treatment, and season (i.e. replicate). The statistical significance of main effects and interaction terms in the model was tested with F-tests by analysis of deviance (ANODEV), by looking at the change in deviance caused by the removal of each term from the maximal model after having allowed for overdispersion in the data by calculating a variance heterogeneity coefficient with the Williams' algorithm (32, 33). Confidence limits for median (ET_{50}) were calculated using Fieller's theorem (32, 33).

Results

Vector population composition and insecticide resistance status

Molecular analysis revealed, as expected, a marked change between seasons in molecular form composition and insecticide resistance status (Table 1). During the dry season replicate of the trial, the molecular form S accounted for 5% of the *Anopheles gambiae* s.s. population, whereas at the end of the dry season it represented 85% of the sample. Accordingly, the *Kdr* allele, which confers resistance to pyrethroids, was found at a frequency of 8% in the *An.*

An. gambiae s.s. sample during the dry season replicate and at 88% at the end of the rainy season.

Similarly, the frequency of the *AceI^R* allele, which confers resistance to organophosphates and carbamates, increased from 1% at the end of the dry season to 40% during the rainy season. The change in frequency of the insecticide resistance genes reflects the fact that these genes float at high frequency only in the molecular form S of *An. gambiae*.

Efficacy of repellents + OP mixtures against deltamethrin

The analysis of deviance showed that the three-way interaction term between TIME*TREATMENT*SEASON was statistically significant ($F_{n,m}=4.705$; $P=0.01$), indicating that the decrease with time in the lethal effect was significantly different for treatments and between seasons. Hence, the minimal adequate model was those with a different curve relating the decrease of mortality with days post-treatment for each combination of treatments and seasons (Figure 1). Accordingly, the estimates of the regression parameters for the six logistic curves are shown in Table 3, together with the inferred effective times in days post-treatment.

During the dry season replicate, lethality of the PM+KBR 3023 mixture lasted longer than KO-thrin over the first 15 days post-treatment ($ET_{90}^{PM+KBR} = 11.2$ days vs. $ET_{90}^{KO-thrin} = 4.7$ days – Figure 1d and Table 2). The PM+DEET mixture was as efficient as KO-thrin over only about 4 days (figure 1 d). The efficacy of the nets impregnated with the two mixtures decreased faster ($b^{PM+KBR} = -0.339 \pm 0.059$; $b^{PM+DEET} = -0.192 \pm 0.036$) than KO-Thrin ($b^{KOthrin} = -0.099 \pm 0.048$) (Figure 1d). This explains the shorter median effective time of the two mixtures.

The trend was different for the rainy season replicate, because the lethality of nets impregnated with KO-thrin was consistently lower than that of the dry season replicate

(Figure 1c), in view of the change in molecular form composition and insecticide resistance status of the vector population (Table 1). Efficacies of the PM+DEET and PM+KBR 3023 were significantly higher than the deltamethrin formulation against the *An. gambiae* population carrying high frequencies of the *Kdr* and *Ace1^R* genes. Indeed, KO-thrin never induced more than 55% mortality throughout the course of the replicate, whereas the PM+DEET and PM+KBR 3023 mixtures killed $\geq 90\%$ of the exposed mosquitoes up until about 4 and 7 days post-treatment, respectively (Table 3 and Figure 1e).

There was no difference between the model estimates of the PM+DEET mixture between the two replicates (Student t-test: $t_a=0.248$; $P=0.8$; $t_b=0.101$; $P=0.92$) (Figure 1a), indicating that the response in mortality through time was the same across seasons. Conversely, the PM+KBR 3023 efficacy changed significantly across replicates ($t_a=3.34$; $P<0.01$; $t_b=2.01$; $P<0.05$): lethality was lower during the rainy season shortly after impregnation of the nets, but the decrease with time in efficacy was subsequently slower (Figure 1d). Similarly, a significant difference in efficacy between the two seasons was observed for KO-thrin ($t_a=2.55$; $P<0.05$; $t_b=4.06$; $P<0.005$), with induced mortality being much lower during the rainy season than the dry season; lethality of the nets, however, was always higher during the dry season replicate up until the end of the 27-days replicates, despite a slower decrease with time in efficacy for the rainy season replicate (Figure 1c).

Impact of treatments on insecticide resistance genotypes

A total of 192 *An. gambiae* females were genotyped for molecular form status, *Kdr* and *Ace1^R* genes. Because of severe restrictions in gene flow between the M and S molecular forms (34, 35) which lead to marked differences in their resistance status (11), we chose to investigate the selection pressure of our three treatments only against the S molecular form of *An. gambiae* (88% of the total population collected in rainy season, Table 1). The results of *Kdr*

genotyping of 151 specimens are shown in Table 3. The gene was in Hardy-Weinberg equilibrium ($p=1$). There was no evidence for a significantly higher frequency of Kdr^R allele in those that survived the three treatments. No Kdr^S/Kdr^S or Kdr^R/Kdr^S mosquito survived with the KO-thrin treatments in contrast with PM+DEET and PM+KBR treatments, but samples of susceptible genotype was too low. The results of the $Ace1^R$ genotyping of 151 S form *An. gambiae* are shown in table 4. We observed an heterozygote excess for $Ace1^R$ gene (p value). There is no evidence for a significantly higher frequency of $Ace1^R$ allele in those that survived the three treatments.

Discussion

Our results from an area of insecticide resistance near Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, demonstrated that a mixture of an organophosphate (pirimiphos-methyl) and an insect repellent (either DEET or KBR 3023) on mosquito nets was as lethal as the pyrethroid deltamethrin for a few days against a susceptible *An. gambiae* s.s. population. However, the efficacy of the two mixtures was substantially higher than deltamethrin against a multilocus resistant *An. gambiae* population (mainly composed of the molecular form S) carrying two resistance genes for pyrethroids and organophosphates/carbamates (Kdr and $Ace1^R$, respectively), at moderate to high frequency. The efficacy of the mixtures was due to strong synergism between the two active ingredients, as demonstrated in another study (Pennetier et al., submitted). Some OPs like chlorpyriphos methyl (20, 37), or pirimiphos methyl (38), and the carbamate carbosulfan (38, 39), were also recently tested on nets to verify their efficacy in terms of induced mortality against pyrethroid-resistant populations of *An. gambiae*, and were found as lethal as deltamethrin, lambda cyalothrin, or permethrin. The major constraint to the use of OPs or carbamates on bed-nets is their higher toxicity to humans (18, 40), and the

1
2 possibility to induce a selection pressure for resistance mechanisms other than *Kdr*, such as
3 the insensitive acetyl cholinesterase (*AcEl^R*) (41). In view of these results, the concept of
4 mixing an insect repellent with an organophosphate (OP) offers a potential alternative to the
5 use of pyrethroids on mosquito nets;
6
7
8
9
10
11
12
13

14 There are, however, several advantages in using mixtures of insect repellents and OPs. First,
15 the addition of a repellent allows the use of lower dosages of OPs. The recommended dose of
16 pirimiphos methyl to achieve a mortality close to 100% is 1000 mg/m² (38, 42). This is six
17 fold the dosage that we used in our mixtures. The possibility to use insecticides with different
18 modes of action at lower dosages than either ingredients used alone was also observed in
19 previous studies with OP/pyrethroid mixtures (19, 20). Second, the behavioural effects of
20 pyrethroids on mosquito nets, such as irritancy, that confer personal protection to the sleeper
21 under the net are restored by the presence of the repellent in RITNs. Previous laboratory
22 studies on repellent + OP mixtures already focused on this property. These studies showed
23 that the mixtures have the same irritant effect than pyrethroids (24), and induce protection
24 against blood feeding (25). Our field trial confirmed the excito-repellency of the repellent +
25 OP mixtures (data presented in a companion paper). Third, we could not detect significant
26 differences in the frequency of two important insecticide resistance genes, *Kdr* and *AcEl^R*
27 among mosquitoes that survived or died after exposure to RITNs, indicating that PM+DEET
28 and PM+KBR 3023 would not select for any of these two resistance alleles. Thus, RITNs
29 appear as a promising tool to control malaria vectors in areas of insecticide resistance.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Our results show that mortality in response to treated nets changed between seasons depending on the combination of repellent and insecticide used. The response to the PM+DEET mixture did not change with the resistance status of the *An. gambiae* population, whereas the PM+KBR 3023 efficacy decreased significantly at the end of the rainy season,

but lasted comparatively longer than during the dry season replicate of the trial. This difference may result from a difference in mode of action of the two insect repellents used in our trial, and their interaction with the insecticide pirimiphos-methyl. Indeed, PM is an AChE inhibitor and it has been recently shown that DEET exerts a neurotoxic effect through alteration of both neuronal function and synaptic transmission (43). DEET increases the release of ACh in synaptic cleft, which led to hypothesize that synergism between the OP and DEET due to the implication of pre-synaptic muscarinic receptors involved in the negative feedback regulation process (44), which thereby modulated Ach release. The exact mode of action of KBR 3023 is not known yet, hence it is probably premature to propose an explication of why its efficacy changed in response to changes in the resistance status of the vector population.

At present, it is as yet not possible to envisage the use of RITNs in community-based vector control programmes because of the short persistence of the lethal effect induced by the OP + repellent mixture (1-2 weeks depending on season and combination). This is presumably due to the high vapour pressure of the repellents, which act mainly in the vapour phase, and hence do not persist long enough on the net at higher than threshold concentrations. However, long-lasting formulations, such as resins, micro capsules, cyclodextrins, etc. might increase the persistence of the mixture on the net. We suggest that industry should have a vital role to play in the development of such more adapted formulations. We are currently testing a microencapsulated formulation of DEET + PM with encouraging preliminary results (data not shown).

Another factor preventing the immediate application of the RITN concept in the field is the lack of knowledge of the toxicological properties of repellent + OP mixtures. Despite the fact that the two repellents and pirimiphos-methyl are reported as safe products (45-49), little is

known about the interaction of repellents with OPs. As a cautionary tale, we ought to note that toxicological interactions between DEET and pyperonyl-butoxide (PBO), an AChE inhibitor, are supposed to be involved in the Gulf War Syndrome (50-53), a pathologic condition leading to sensorimotor deficits and alterations of the cholinergic system that was first described in 1994 from soldiers who had applied DEET on the skin and worn battle uniforms impregnated with permethrin synergized with PBO for the prevention of vector-borne diseases on the Iraqi battle grounds (54). It is worth noting, however, that the reported neurological pathologies occurred after rats received DEET and PBO by dermal application. We used an AChE inhibitor (an OP, pirimiphos-methyl) with DEET, but in our case none of these compounds were applied on the skin, and the DEET concentration we used on nets was lower by >5 fold than that applied on the soldiers' skin during the Gulf War episode. Nevertheless, it is crucially important to confirm by appropriate toxicological studies that there are no adverse health effects in using organophosphate- + repellent at the operational doses that are used to impregnated bed-nets.

In summary, we conclude that the application of low doses of an OP + insect repellents as mixtures on mosquito nets was as much or more lethal shortly after application than the pyrethroid deltamethrin against the malaria vector *An. gambiae* in an area of multiple insecticide resistance. The recent concept of combining repellents with insecticides is still limited by the short residual effect of the treatments and the lack of toxicological knowledge, but it appears as a potential tool warranting further development for the control of malaria vectors and management of insecticide resistance in areas of endemic transmission.

Acknowledgments

We sincerely thank the team of VK7 for their excellence during field work, and the people of VK7 for their hospitality. Many thanks to Seth Irish who provided helpful comments.

This study was financially supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR, program REACT n° 2006 SEST 030 01) and Osler Company (Melun, France). CP was supported by Service de Coopération et d'Action Culturelle (SCAC) de Cotonou (Volontaire International fellowship) and François Lacoste and the Fondation de France (Student fellowship).

Mr Cédric Pennetier of Institut de Recherche pour le Développement is a PhD student. His current research interests are identifying alternative chemicals or new strategies to maintain the effectiveness of impregnated materials used in vector control programs.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.

Legends

Table 1: Frequency of S molecular form of *An. gambiae*, of Knock Down Resistance (*Kdr*) allele and insensitive acetylcholinesterase (*Ace.I^R*) allele. Samples have been randomly taken in the control hut.

Table 2: Regression parameters (SE) and median and 90% effective time (95% confidence interval) expressed in days of the minimal adequate regression model fitted to the experimental hut data. A) First trial run in dry season (May and June); B) second trial run in rainy season (September and October).

1
2
3
4
5
6
7
8
Table 3: Mortality rate among *Kdr* genotypes.

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
Table 4: Mortality rate among *Ace.I^R* genotypes.

28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Figure 1: Decline with time of RITN efficacy. (A) Comparison between PM+DEET treated net efficacy between the two seasons. (B) Comparison between PM+KBR treated net efficacy between the two seasons. (C) Comparison between KO-Thrin treated net efficacy between the two seasons. (D) Comparison between PM+DEET, PM+KBR and KO-thrin during the first trial in dry season. (E) Comparison between PM+DEET, PM+KBR and KO-thrin during the second trial in rainy season. Curves drawn according logistic plane regression of Equation (1) whose parameters are shown in Table 2.

References

1. World_Health_Organization. The world malaria report 2005. Geneva, World Health Organization. 2005: Available: <http://rbm.who.int/wmr2005/>.
2. Killeen GF, McKenzie FE, Foy BD, Schieffelin C, Billingsley PF, Beier JC. A simplified model for predicting malaria entomologic inoculation rates based on entomologic and parasitologic parameters relevant to control. Am J Trop Med Hyg. 2000 May;62(5):535-44.
3. Killeen GF, McKenzie FE, Foy BD, Schieffelin C, Billingsley PF, Beier JC. The potential impact of integrated malaria transmission control on entomologic inoculation rate in highly endemic areas. Am J Trop Med Hyg. 2000 May;62(5):545-51.
4. WHO. The place of DDT in operations against malaria and other vector-borne diseases. Geneva: World Health Organization, 1971(Official records of the World health

Organization No 190: 176-182) Executive board 47th session, 19-29 January 1971, part II

Report on the proposed programme and budget estimates for 1972; 1972.

5. Curtis CF, Mnzava AE. Comparison of house spraying and insecticide-treated nets for malaria control. *Bull World Health Organ.* 2000;78(12):1389-400.
6. Charlwood JD, Dagoro H. Impregnated bed nets for the control of filariasis transmitted by *Anopheles punctulatus* in rural Papua New Guinea. *P N G Med J.* 1987 Sep;30(3):199-202.
7. Roberts DR, Vanzie E, Bangs MJ, Grieco JP, Lenares H, Hshieh P, et al. Role of residual spraying for malaria control in Belize. *J Vector Ecol.* 2002 Jun;27(1):63-9.
8. Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol.* 2000 Mar;14(1):1-5.
9. CDC. Insecticide Treated Bed Nets. In: *Malaria_Vector_Control*, editor. Center of Disease Control and Prevention. Atlanta, USA:
http://www.cdc.gov/malaria/control_prevention/vector_control.htm#itn; 2007.
10. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, et al. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from west Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia.* 1999 Sep;41(1-3):319-22.
11. Diabate A, Brengues C, Baldet T, Dabire KR, Hougard JM, Akogbeto M, et al. The spread of the Leu-Phe kdr mutation through *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso: genetic introgression and de novo phenomena. *Trop Med Int Health.* 2004 Dec;9(12):1267-73.
12. Hargreaves K, Koekemoer LL, Brooke BD, Hunt RH, Mthembu J, Coetzee M. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. *Medical and Veterinary Entomology.* 2000;14(2):181-9.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
13. Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*. 2000;9(5):491-7.
14. Chandre F, Darriet F, Duchon S, Finot L, Manguin S, Carnevale P, et al. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*. 2000;14(1):81-8.
15. Corbel V, Chandre F, Brengues C, Akogbeto M, Lardeux F, Hougard JM, et al. Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malar J*. 2004 Jul 8;3(1):22.
16. N'Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerging Infectious Diseases*. 2007 Febuary;13(2):199-206.
17. Zaim M, Guillet P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends Parasitol*. 2002 Apr;18(4):161-3.
18. Guillet P, N'Guessan R, Darriet F, Traore-Lamizana M, Chandre F, Carnevale P. Combined pyrethroid and carbamate 'two-in-one' treated mosquito nets: field efficacy against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus*. *Med Vet Entomol*. 2001 Mar;15(1):105-12.
19. Hougard JM, Corbel V, N'Guessan R, Darriet F, Chandre F, Akogbeto M, et al. Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Cote d'Ivoire. *Bull Entomol Res*. 2003 Dec;93(6):491-8.
20. Asidi AN, N'Guessan R, Koffi AA, Curtis CF, Hougard JM, Chandre F, et al. Experimental hut evaluation of bednets treated with an organophosphate (chlorpyrifos-

1
2 methyl) or a pyrethroid (lambdacyhalothrin) alone and in combination against insecticide-
3 resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Malar J.* 2005 May
4 26;4(1):25.
5
6

7 21. Corbel V, Chandre F, Darriet F, Lardeux F, Hougard JM. Synergism between
8 permethrin and propoxur against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Med Vet Entomol.*
9 2003 Jun;17(2):158-64.
10
11

12 22. Corbel V, Darriet F, Chandre F, Hougard JM. Insecticide mixtures for mosquito net
13 impregnation against malaria vectors. *Parasite.* 2002 Sep;9(3):255-9.
14
15

16 23. Corbel V, Raymond M, Chandre F, Darriet F, Hougard JM. Efficacy of insecticide
17 mixtures against larvae of *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) resistant to
18 pyrethroids and carbamates. *Pest Manag Sci.* 2004 Apr;60(4):375-80.
19
20

21 24. Pennetier C, Corbel V, Hougard JM. Combination of a non-pyrethroid insecticide and
22 a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *Am J Trop Med
23 Hyg.* 2005 Jun;72(6):739-44.
24
25

26 25. Pennetier C, Corbel V, Boko P, Odjo A, N'Guessan R, Lapiéd B, et al. Synergy
27 between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated
28 nets against *Anopheles gambiae*. *Malar J.* 2007;6:38.
29
30

31 26. Darriet F, Guillet P, N'Guessan R, Doannio JM, Koffi A, Konan LY, et al. [Impact of
32 resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of
33 impregnated mosquito nets]. *Med Trop (Mars).* 1998;58(4):349-54.
34
35

36 27. N'Guessan R, Darriet F, Doannio JM, Chandre F, Carnevale P. Olyset Net efficacy
37 against pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* after 3 years'
38 field use in Côte d'Ivoire. *Med Vet Entomol.* 2001 Mar;15(1):97-104.
39
40

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
28. Favia G, Lanfrancotti A, Spanos L, Siden Kiamos I, Louis C. Molecular characterization of ribosomal DNA polymorphisms discriminating among chromosomal forms of *Anopheles gambiae* s.s. Insect Molecular Biology. 2001;10(1):19-23.
29. Martinez Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, et al. Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. Insect Molecular Biology. 1998;7(2):179-84.
30. Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquine M, et al. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. Insect Mol Biol. 2004 Feb;13(1):1-7.
31. Payne C. The GLIM system release 3.77 Manual. Numerical Algorithms Group Ltd, Oxford. 1987.
32. Collett D. Modelling Binary Data. Chapman & Hall/CRC, London. 1991.
33. Crawley M. GLIM for Ecologists. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1993.
34. Stump AD, Shoener JA, Costantini C, Sagnon N, Besansky NJ. Sex-linked differentiation between incipient species of *Anopheles gambiae*. Genetics. 2005 Mar;169(3):1509-19.
35. Stump AD, Fitzpatrick MC, Lobo NF, Traore S, Sagnon N, Costantini C, et al. Centromere-proximal differentiation and speciation in *Anopheles gambiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 1;102(44):15930-5.
36. Djogbenou LS, Weill M, Hougard JM, Raymond M, Akogbeto M, Chandre F. Characterization on insensitive acetyl cholinesterase (*ace-1^R*) in *Anopheles gambiae* (Diptera; Culicidae): Resistance levels and dominance. J Med Entomol. 2007;in press.
37. N'Guessan R, Boko, P., Odjo, A., Chabi, J., Akogbeto, M., Rowland, M. Experimental hut trials of chlorpyrifos methyl against *Kdr* resistant and susceptible *An. gambiae*, West

Africa: an insecticide to replace DDT or supplement pyrethroids. *Malaria Journal.*

2007;(submitted).

38. Kolaczinski JH, Fanello C, Herve JP, Conway DJ, Carnevale P, Curtis CF.

Experimental and molecular genetic analysis of the impact of pyrethroid and non-pyrethroid insecticide impregnated bednets for mosquito control in an area of pyrethroid resistance. *Bull Entomol Res.* 2000 Apr;90(2):125-32.

39. N'Guessan R, Darriet F, Guillet P, Carnevale P, Traore-Lamizana M, Corbel V, et al.

Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from Ivory Coast, based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. *Med Vet Entomol.* 2003 Mar;17(1):19-25.

40. WHO. A generic risk assessment model for insecticide treatment and subsequent use of mosquito nets. WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/20046. 2004.

41. Corbel V, Hougard JM, N'Guessan R, Chandre F. Evidence for selection of insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase by carbamate-treated nets in *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) from Cote d'Ivoire. *J Med Entomol.* 2003 Nov;40(6):985-8.

42. Fanello C, Kolaczinski JH, Conway DJ, Carnevale P, Curtis CF. The kdr pyrethroid resistance gene in *Anopheles gambiae*: tests of non-pyrethroid insecticides and a new detection method for the gene. *Parassitologia.* 1999 Sep;41(1-3):323-6.

43. Lapiel B, Pennetier C, Stankiewicz M, Gautier H, Fournier D, Hougard JM, et al. The insect repellent DEET exerts neurotoxic effects through alterations of both neuronal function and synaptic transmission. *FENS 2006, 5th Forum of European Neuroscience;* 2006 July 8-12; Vienna, Austria; 2006.

44. Corbel V, Stankiewicz M, Bonnet J, Grolleau F, Hougard JM, Lapiel B. Synergism between insecticides permethrin and propoxur occurs through activation of presynaptic muscarinic negative feedback of acetylcholine release in the insect central nervous system. *Neurotoxicology.* 2006 Mar 2:1-12.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
45. Koren G, Matsui D, Bailey B. DEET-based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. *Cmaj.* 2003 Aug 5;169(3):209-12.
46. McGready R, Hamilton KA, Simpson JA, Cho T, Luxemburger C, Edwards R, et al. Safety of the insect repellent N,N-diethyl-M-toluamide (DEET) in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Oct;65(4):285-9.
47. Buka RL. Sunscreens and insect repellents. *Curr Opin Pediatr.* 2004 Aug;16(4):378-84.
48. Kendrick DB. Mosquito repellents and superwarfarin rodenticides--are they really toxic in children? *Curr Opin Pediatr.* 2006 Apr;18(2):180-3.
49. Tomlin CDS. The e-Pesticide Manuel, a World Compendium. British Crop Protection Council, London, United Kingdom. 2007.
50. Abou-Donia MB, Wilmarth KR, Abdel-Rahman AA, Jensen KF, Oehme FW, Kurt TL. Increased neurotoxicity following concurrent exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and chlorpyrifos. *Fundam Appl Toxicol.* 1996 Dec;34(2):201-22.
51. Abou-Donia MB, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Abdel-Rahman A, Bullman SL, Khan WA. Co-exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and/or permethrin causes sensorimotor deficit and alterations in brain acetylcholinesterase activity. *Pharmacol Biochem Behav.* 2004 Feb;77(2):253-62.
52. Abdel-Rahman A, Dechkovskaia AM, Goldstein LB, Bullman SH, Khan W, El-Masry EM, et al. Neurological deficits induced by malathion, DEET, and permethrin, alone or in combination in adult rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2004 Feb 27;67(4):331-56.
53. Abdel-Rahman A, Abou-Donia S, El-Masry E, Shetty A, Abou-Donia M. Stress and combined exposure to low doses of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin produce neurochemical and neuropathological alterations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *J Toxicol Environ Health A.* 2004 Jan 23;67(2):163-92.

- 1
2
3 54. Milner IB, Axelrod BN, Pasquantonio J, Sillanpaa M. Is there a Gulf War syndrome?
4
5 Jama. 1994 Mar 2;271(9):661.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Peer Review

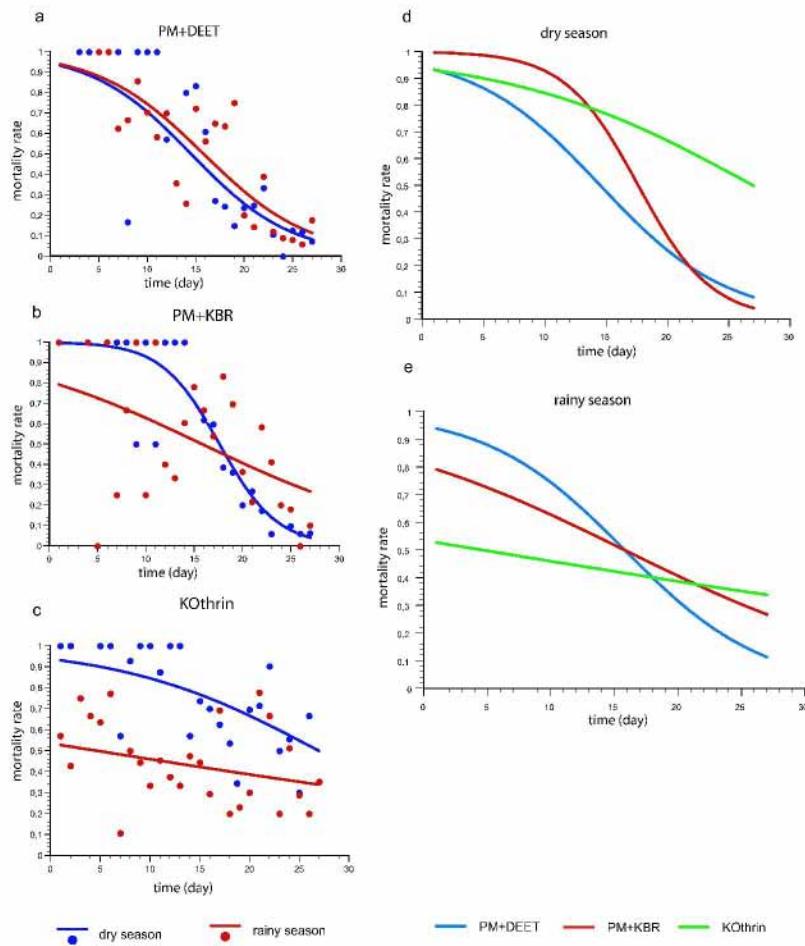


figure 1

210x297mm (600 x 600 DPI)

Table 1

	S form frequency (n tested)	Kdr frequency (n tested)	Ace ^{1R} frequency (n tested)
May-June (dry season)	0,05 (43)	0,08 (41)	0,01 (40)
September- October (rainy season)	0,85 (49)	0,88 (48)	0,40 (49)

Table 2

A. Dry season

treatment	a	b	ET ₅₀	ET ₉₀
PM+DEET	2,814 (±0,737)	-0,194 (±0,039)	14,5 (11,1-16,4)	3,2
PM+KBR	5,932 (±0,628)	-0,337 (±0,032)	17,6 (16,8-18,2)	11,1
KO-Thrin	2,693 (±0,656)	-0,100 (±0,033)	26,8 (22,7-42,2)	4,9

B. Rainy season

treatment	a	b	ET ₅₀	ET ₉₀
PM+DEET	2,907 (±0,520)	-0,184 (±0,030)	15,8 (13,8-17,7)	3,9
PM+KBR	1,424 (±0,657)	-0,090 (±0,036)	15,9 (5,4-22,7)	-
KO-Thrin	0,136 (±0,320)	-0,030 (±0,019)	4,5 (0-13,9)	-

Table 3

Kdr	Number tested		Mortality % (n)		P (F exact test)*
	SS or RS	RR	SS or RS	RR	
PM+DEET	4	45	25% (1)	57,8% (26)	0,323
PM+KBR	7	44	40% (2)	59,1% (26)	0,239
KOThrin	2	49	100% (2)	53,1% (17)	0,064

*Numbers of the Kds/Kds and Kdr/Kds were too small to allow Khi² tests on the numbers of each genotype; therefore significance tests were carried out on numbers of Kdr and Kds alleles among live and dead mosquitoes.

Table 4

<i>AcE1^R</i>	Number tested		Mortality % (n)		P (F exact test)*
	SS	RR or RS	SS	RR or RS	
PM+DEET	4	39	50% (2)	59% (23)	0,662
PM+KBR	3	28	33,3% (1)	50% (14)	1,000
KOThrin	4	29	75% (3)	31% (9)	0,442

*Numbers of the *Ace.1^R/Ace.1^R* and *Ace.1^R/Ace.1^S* were too small to allow χ^2 tests on the numbers of each genotype; therefore significance tests were carried out on numbers of *Ace.1^R* and *Ace.1^S* alleles among live and dead mosquitoes.

Peer Review

EMERGING INFECTIOUS DISEASES

A Peer-Reviewed Journal Tracking and Analyzing Disease Trends

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Centers for Disease Control and Prevention
1600 Clifton Road, N.E.
Mail stop D61
Atlanta, GA 30333
Phone: 404-371-5329
Fax: 404-371-5449

Checklist for Authors

First Author and Manuscript Title: Cédric Pennetier, manuscript entitled: "A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low-dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than a pyrethroid against multilocus resistant *Anopheles gambiae*"

<input checked="" type="checkbox"/>	This manuscript (or one with substantially similar content) has not been published and is not being considered for publication elsewhere.
<input checked="" type="checkbox"/>	Corresponding author is the primary contact for proofing the manuscript and galleys.
<input checked="" type="checkbox"/>	Financial support for this research is clearly disclosed in the manuscript.
<input checked="" type="checkbox"/>	Any organization with a financial interest in the subject matter is disclosed in the manuscript.
<input checked="" type="checkbox"/>	Authors have disclosed any conflict of interest related to this article.
<input checked="" type="checkbox"/>	Research has been approved by appropriate human or animal subjects research review boards, which are named in the text of the manuscript.
<input type="checkbox"/>	DNA and amino acid sequences have been submitted to a sequence database and accession numbers are used to refer to the sequences.
<input checked="" type="checkbox"/>	All persons who have made substantial contributions to this work but did not fulfill the authorship criteria are named in the Acknowledgments.
<input checked="" type="checkbox"/>	Written permission has been obtained from all persons listed in the acknowledgments.
<input checked="" type="checkbox"/>	Written permission has been obtained from all persons listed as authors on this manuscript.
<input type="checkbox"/>	Written permission has been obtained from the publishers of any figures or tables previously published or adapted from published figures or tables.
<input type="checkbox"/>	Written permission has been obtained from persons identifiable in photographs, case descriptions, or pedigrees.
<input checked="" type="checkbox"/>	Written permission has been obtained from persons named in personal communications (oral or written) stating that they agree to be named and that the information cited is accurate.
<input checked="" type="checkbox"/>	All pages are double-spaced, numbered, and left justified (ragged right margin).
<input checked="" type="checkbox"/>	All references are cited in the text, follow Uniform Requirements (http://www.icmje.org/index.html), and have been checked for accuracy and completeness.
<input checked="" type="checkbox"/>	Legends for figures are at the end of the text.
<input type="checkbox"/>	Each figure is in a separate file.
<input checked="" type="checkbox"/>	The abstract meets the word count requirement for the type of manuscript (50 words for dispatches, 150 words for all others).
<input checked="" type="checkbox"/>	All units of measure are expressed in SI units per Instructions to Authors.



A short (2-3 sentence) biography is provided for the first author or both if two authors.

Additional notes or statements:

Peer Review

Article 5: article sous presse dans Trans Roy Soc trop Med Hyg, 2007

Deet microencapsulation: a slow release formulation enhancing the residual efficacy of bednets against malaria vectors.

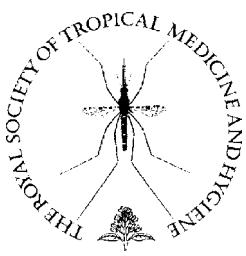
N'Guessan R, Knols BJ, Pennetier C & Rowland MW



available at www.sciencedirect.com



journal homepage: www.elsevierhealth.com/journals/trst



DEET microencapsulation: a slow-release formulation enhancing the residual efficacy of bed nets against malaria vectors

Raphael N'Guessan^{a,b,*}, Bart G.J. Knols^c,
Cedric Pennetier^{b,d}, Mark Rowland^a

^a London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK

^b Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Benin

^c Wageningen University & Research Centre, Laboratory of Entomology, Wageningen, The Netherlands

^d Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Cotonou, Benin

Received 13 April 2007; received in revised form 22 October 2007; accepted 22 October 2007

KEYWORDS

DEET;
Microencapsulation;
Anopheles;
Bed nets;
Efficacy;
Prevention

Summary Textile materials treated with synthetic repellents have the potential to provide protection against insect disease vectors but lack the residual activity necessary to achieve a prolonged effect or to be cost-effective. DEET MC is a formulation of DEET (N,N diethyl-m-toluamide) in which the repellent is gradually released from a capsule that binds the repellent. An experiment carried out on DEET-treated mosquito netting showed that the formulation repels, inhibits blood-feeding and kills mosquitoes for a period of at least 6 months under laboratory conditions. Such formulations may have the potential for use on nets against pyrethroid-resistant mosquitoes or on clothing or bedding materials distributed in disasters, emergencies or refugee camp situations.

© 2007 Published by Elsevier Ltd on behalf of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.

1. Introduction

Resistance to pyrethroid insecticides has become increasingly widespread in the malaria vector *Anopheles gambiae* in western and eastern Africa and in *A. funestus* in southern Africa (Chandre et al., 1999; Hargreaves et al., 2000;

Vulule et al., 1999). The recent failure of insecticide treated nets (ITNs) and indoor residual spraying (IRS) to kill or protect against pyrethroid-resistant *A. gambiae* in southern Benin (N'Guessan et al., 2007a) means that identifying alternative insecticides and repellents to supplement or replace the pyrethroids has become very urgent (Zaim and Guillet, 2002). A recent study involving impregnation of nets with DEET repellent conducted in experimental huts in Ivory Coast indicated that this is a promising approach to overcome the problems associated with pyrethroid-resistant mosquitoes and potentially prevent malaria (N'Guessan et al., 2006). When deployed on fabric rather than as a topical

* Corresponding author. Present address: Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), 06 BP 2604 Cotonou, Benin.
Tel.: +229 95 05 09 71.

E-mail address: raphael.n'guessan@lshtm.ac.uk (R. N'Guessan).

skin treatment, the DEET acted not only as a conventional insect repellent but also as a toxicant, killing the majority of pyrethroid-resistant *A. gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes that entered the huts. The formulation of DEET tested was a water-miscible lotion suitable for clothing or topical treatment. Being inherently volatile, any effect of DEET on mosquitoes was lost after 2–3 weeks. In the current era of long-lasting insecticidal nets, any formulation that needs such frequent replenishment is unlikely to find favour even in places where pyrethroids are no longer effective. Advances in formulation technology have been important in leading to long-lasting insecticidal nets. Microencapsulation technology, in which the active ingredient is enclosed within a polymer capsule and gradually leaches to the outside is one way in which residual activity may be prolonged. Microcapsule suspensions of pyrethroids are now entering the market as long-lasting indoor residual spray treatments (WHO, 2007). In order for DEET to become viable as a textile treatment, the repellent will need to be bound within some kind of long-lasting formulation. SDS Biotech K.K., Tokyo, Japan has recently developed a microencapsulated formulation of DEET in which the active ingredient diffuses slowly through a polymer membrane over a period of months. Human contact or friction with the treated fabric is believed to accelerate the diffusion process. To examine its potential as a fabric or net treatment, the microencapsulated DEET was applied to polyester netting and tested against *A. gambiae* in laboratory tunnel tests over several months (WHO, 2006). A standard topical formulation of DEET on netting served as a control.

2. Materials and methods

2.1. DEET MC

DEET MC is a 30% aqueous suspension of N,N diethyl-m-toluamide enclosed in a melamine microcapsule, supplied by Sumitomo Corporation, Tokyo, Japan. Median particle size is 4–5 µm. A standard topical, water-miscible formulation of DEET 30% was produced by Osler®, Paris, France. Both formulations were diluted in water and applied at 8 g DEET/m² on 100 denier polyester netting (N'Guessan et al., 2006; Pennetier et al., 2007). The netting samples were first tested 72 h after treatment and re-tested at intervals over 6 months. The netting samples were left unwrapped between tests.

2.2. Tunnel tests

Tunnel tests were undertaken with an insecticide-susceptible laboratory strain Kisumu of *A. gambiae* in Benin (Chandre et al., 2000; N'Guessan et al., 2007b, 2007c). The tunnel test is a laboratory system designed to allow many of the behavioural and toxicological actions that occur with host-seeking mosquitoes in the presence of treated materials. Tunnel tests are done as a forerunner to experimental hut trials, and provide information on repellency, blood-feeding inhibition and mortality. The equipment consists of a square glass cylinder (25 cm high, 25 cm wide, 60 cm long), which is divided into two compartments by a netting-covered frame that slots across

the tunnel (WHO, 2006). In one of the compartments, a guinea pig is housed unconstrained in an open meshed cage and in the other compartment, 100 unfed female anopheline mosquitoes aged 2–5 d are released at dusk and left overnight. The netting is deliberately holed with nine 1 cm holes to provide opportunity for mosquitoes to pass into the baited compartment. The following morning, the number of mosquitoes found live or dead, fed or unfed in each compartment is scored. Live mosquitoes are given access to sugar solution, and monitored up to 24 h to score delayed mortality. For each repellent formulation, two replicate tunnel tests involving 100 mosquitoes per test were conducted on each sample of treated netting at 6 monthly intervals.

The procedure for use of guinea pigs in our tunnel experiments conformed with criteria established in EC Directive 86/609/ECC regarding protection of animals used for experimental purposes.

2.3. Data analysis

A χ^2 test was performed to assess trend in residual efficacy of treatments over time.

3. Results

The effects of the DEET treatments on penetration, blood-feeding and mortality rates are shown in Figure 1.

The unencapsulated formulation inhibited 80% of the mosquitoes from penetrating the holed netting when freshly applied, and over 3–6 months the proportion penetrating decreased significantly from 40 to 10% ($P=0.001$), which was the same rate observed in the untreated control (Figure 1A). With the microencapsulated formulation, passage inhibition was only 40% initially and remained at this level over the full 6 months ($P=0.11$).

Initially, inhibition of blood-feeding was 100% with the unencapsulated formulation, decreasing to 70% at 3 months and to complete loss of activity between 3 and 6 months (Figure 1B). Protection from the microcapsule increased after 1 month and reached a maximum at 6 months, suggesting that a higher concentration of active ingredient was present on the surface of the capsules after this interval.

With the unencapsulated formulation, mortality was 100% initially but showed exponential decay over the 6 months ($P<0.001$) (Figure 1C). Mortality rates with DEET MC remained between 82 and 65% throughout, showing a gradual though significant decay in performance ($P=0.03$).

4. Discussion

When applied to skin, conventional formulations of DEET persist for no more than several hours. When applied to textiles or netting, topical formulations may persist to good effect for 1–3 months. Evaporation or absorption rates on textiles are much slower than on skin. The mode of interaction with host-seeking mosquitoes may differ too. With skin application, mosquitoes are deterred from alighting on the host by a vapour layer of repellent (Debboun et al., 2006). With textile and net applications the mosquitoes make tarsal

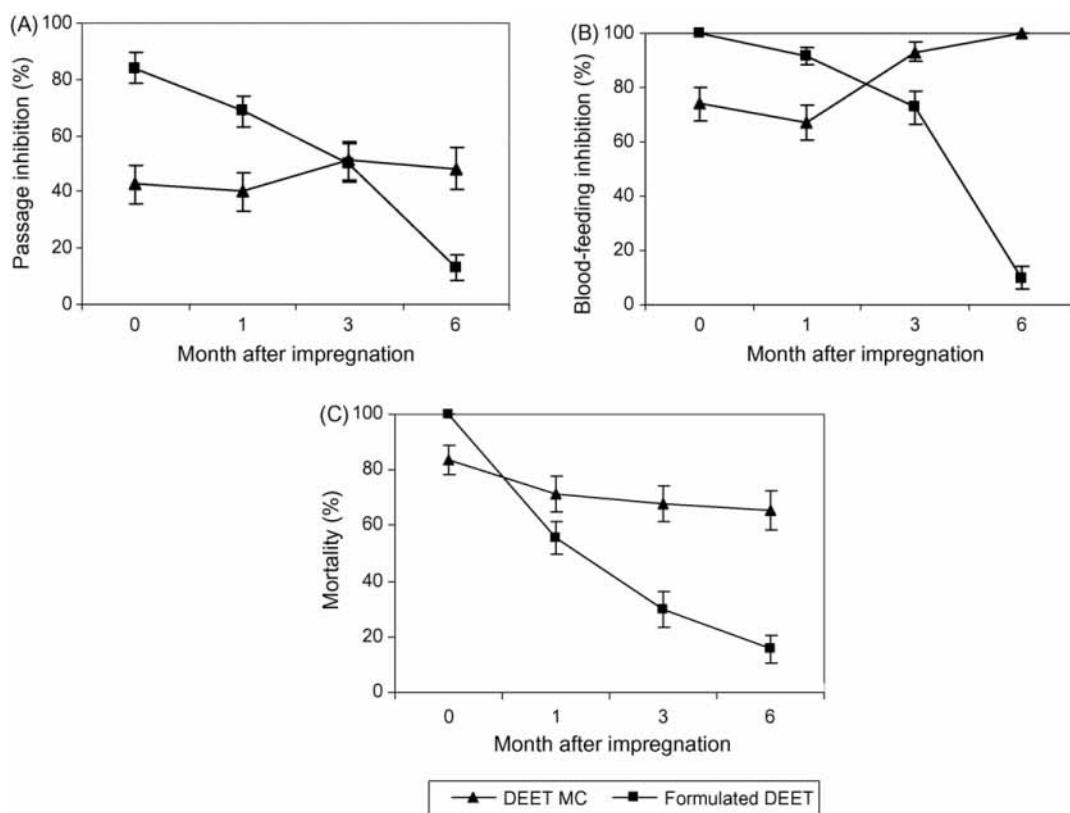


Figure 1 Efficacy of netting treated with DEET MC (encapsulated formulation) and oil-based formulation of DEET against *Anopheles gambiae* in tunnel tests. (A) Inhibition of penetration through the netting (repellency); (B) blood-feeding inhibition rates; (C) mortality rates after a 24 h holding period. Vertical bars indicate 95% CIs.

contact with the treated surface. This route of pick-up is clearly sufficient for DEET to exert a toxic effect, as has been shown in several recent studies on mosquitoes and other insects in laboratory and field experiments (Licciardi et al., 2006; N'Guessan et al., 2006; Pennetier et al., 2005). Micro-capsule particles would adhere to tarsi, as is known to occur with encapsulated insecticide formulations, and would continue to act upon the insect whether or not it took evasive action from the repellent-treated surface.

Microencapsulation has the capacity to greatly prolong the persistence of volatile repellents and to change the way in which we use them for protection. The experiment on netting described here shows that microencapsulated DEET acquires some of the characteristics of residual insecticides, showing a combination of repellent, toxic and feeding-inhibition properties and residual activity lasting several months. The protective effect against biting of *A. gambiae* was superior to that shown by the residual pyrethroid insecticides permethrin (Corbel et al., 2004) and deltamethrin (Hougard et al., 2003) tested under similar conditions.

The formulation was long-lasting in the sense of enabling prolonged residual activity but not in the sense of long-lasting insecticidal nets (LLIN), which are products that remain insecticidal despite repeated washing (WHO, 2005a). The DEET microcapsule formulation is not designed to be wash resistant. That would require further formulation work and possible addition of chemical binders, as used in LLIN technology. Development of a wash-resistant formulation would be a useful next step to take towards a long-lasting

repellent treated net (LLRN) for use against pyrethroid-resistant vectors.

The DEET-treated samples were subjected to only two replicate tests at each test interval. Nevertheless, these were consistent in demonstrating the exceptional residual activity of DEET MC. Treated nets under normal use in the field are subject to regular friction and frequent contact with users, and this may contribute towards greater removal of particles from the fibres than indicated in our laboratory tests, where material was held undisturbed between tests. It is imperative that in the next stage to evaluation the trials of DEET MC-treated bed nets be conducted in experimental huts to ascertain their residual efficacy and personal protection under natural conditions.

The current DEET microcapsule formulation may have potential in a number of situations where protection is required for several months and where washing is infrequent. For outbreaks of dengue transmitted by day-active *Aedes aegypti* mosquitoes, the DEET might be applied to clothing or domestic fabrics such as curtains. For epidemics of malaria or in refugee situations where people are sleeping outdoors or in makeshift shelters, the DEET microcapsule might be used to treat the blankets or sheets that are distributed by aid agencies in such emergencies. Experience has shown that insecticide-treated nets are not necessarily appropriate in emergencies (WHO, 2005b), whereas repellent-treated blankets would not require behavioural change of users to be used to good effect.

Authors' contributions: RN and MR conceived the study protocol; RN analysed and interpreted the data and wrote the manuscript; BGJK and CP contributed to the study design and analysis and revised the manuscript; MR revised the paper substantially for intellectual content. All authors read and approved the final manuscript. RN is guarantor of the paper.

Acknowledgements: We thank Boko P. and Odjo A. for valued technical assistance. We are very grateful to Mr Takanori Ando of Sumitomo Corporation, Tokyo, Japan for providing DEET MC formulation and for technical advice. We thank Dr Jean Marc Hougard of Institut de Recherche pour le Development, Cotonou, Benin for providing the topical DEET formulation for comparison.

Funding: The study was supported by the Gates Malaria Partnership of the London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK (grant no. GMP/ITDCVG03).

Conflicts of interest: None declared.

Ethical approval: The study received approval from the Ministry of Health, Cotonou, Republic of Benin, on 4 November 2005 (approval no. 10715/MSP/DG/SGM/DRS).

References

- Chandre, F., Darriet, F., Manga, L., Akogbeto, M., Faye, O., Mouchet, J., Guillet, P., 1999. Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. Bull. World Health Organ. 77, 230–234.
- Chandre, F., Darriet, F., Duchon, S., Finot, L., Manguin, S., Carnevale, P., Guillet, P., 2000. Modifications of pyrethroid effects associated with kdr mutation in *Anopheles gambiae*. Med. Vet. Entomol. 14, 81–88.
- Corbel, V., Chandre, F., Brengues, C., Akogbeto, Lardeux, F., Hougard, J.M., Guillet, P., 2004. Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. Malaria J. 3, 22.
- Debboun, M., Frances, S.P., Strickman, D., 2006. Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses. CRC Press, London.
- Hargreaves, K., Koekemoer, L.L., Brooke, B., Hunt, R.H., Mthembu, J., Coetzee, M., 2000. *Anopheles funestus* resistant to pyrethroid insecticides in South Africa. Med. Vet. Entomol. 14, 181–189.
- Hougard, J.M., Duchon, S., Darriet, F., Zaim, M., Rogier, C., Guillet, P., 2003. Comparative performances, under laboratory conditions, of seven pyrethroid insecticides used for impregnation of mosquito nets. Bull. World Health Organ. 5, 324–333.
- Licciardi, S., Herve, J.P., Darriet, F., Hougard, J.M., Corbel, V., 2006. Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays. Med. Vet. Entomol. 20, 288–293.
- N'Guessan, R., Rowland, M., Moumouni, T.L., Kesse, B., Carnevale, P., 2006. Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 100, 1091–1097.
- N'Guessan, R., Corbel, V., Akogbeto, M., Rowland, M., 2007a. Reduced efficacy of insecticide treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. Emerg. Inf. Dis. 13, 199–206.
- N'Guessan, R., Corbel, V., Bonnet, J., Yates, A., Asidi, A., Boko, P., Odjo, A., Akogbeto, M., Rowland, M., 2007b. Evaluation of indoxacarb, an oxadiazine insecticide for the control of pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 44, 270–276.
- N'Guessan, R., Boko, P., Odjo, A., Akogbeto, M., Yates, A., Rowland, M., 2007c. Chlorfenapyr: a pyrrole insecticide for the control of pyrethroid or DDT resistant *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. Acta Trop. 102, 69–78.
- Pennetier, C., Corbel, V., 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., Lapiel, B., Hougard, J.M., 2007. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. Malaria J. 29, 6–38.
- Vulule, J.M., Beach, R.F., Atieli, F.K., McAllister, J.C., Brogden, W.G., Roberts, J.M., Mwangi, R.W., Hawley, W.A., 1999. Elevated oxidase and esterase levels associated with permethrin tolerance in *An. gambiae* from Kenyan villages using permethrin-impregnated nets. Med. Vet. Entomol. 13, 239–244.
- WHO, 2005a. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Long-lasting Insecticidal Mosquito Nets. World Health Organization, Geneva, WHO/CDS/WHOPE/GCDPP/2005.11.
- WHO, 2005b. Malaria Control in Complex Emergencies: an Inter-agency Field Handbook. World Health Organization, Geneva, WHO/HTM/MAL/2005.1107.
- WHO, 2006. Guidelines for Testing Mosquito Adulticides for Indoor Residual Spraying and Treatment of Mosquito Nets. World Health Organization, Geneva, WHO/CDS/NTD/WHOPE/GCDPP/2006.3.
- WHO, 2007. Report on the Tenth WHOPE Working Group Meeting. World Health Organization, Geneva, WHO/CDS/NTD/WHOPE/2007.1.
- Zaim, M., Guillet, P., 2002. Alternative insecticides: an urgent need. Trends Parasitol. 18, 161–163.

Article 6: article en préparation

***DEET inhibits acetylcholinesterase activity in both insect and
human central nervous system***

Corbel V, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D, Dimitrov M, Gautier H, Stojan J,
Hougard J-M & Lapiel B

The dark side of DEET: first evidence for inhibition of cholinesterases from insect and mammalian nervous systems

Vincent Corbel¹, Maria Stankiewicz², Cédric Pennetier^{3,5}, Didier Fournier⁴, Jure Stojan⁶, Emmanuelle Girard⁷, Mitko Dimitrov⁴, Jordi Molgó⁷, Jean-Marc Hougard³ & Bruno Lapiéd⁵

¹ *Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, Institut de Recherche pour le Développement, 911 Avenue Agropolis, BP 64 501, F-34 394 Montpellier, France;*

² *Institute of General & Molecular Biology, N. Copernicus University, 87-100 Torun, Poland,*

³ *Institut de Recherche pour le Développement / Centre de Recherches Entomologiques de Cotonou, 01 BP 4414, République du Bénin.*

⁴ *Groupe de Biotechnologie des protéines, Université de Toulouse, IPBS, UMR5089, 31077, Toulouse, France.*

⁵ *Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES EA 2647 / USC INRA, Université d'Angers, UFR Sciences, 2 boulevard Lavoisier, F-49045 Angers cedex, France.*

⁶ *Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia.*

⁷ *CNRS, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard – FRC2118, Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire – UPR9040, Gif sur Yvette, F-91198, France*

N,N-Diethyl-m-Toluamide (DEET) remains the gold standard for insect repellents¹. About 200 million people use it every year and over 8 billion doses have been applied over the past 40 years². Despite a long history of use and an increasing role in public health programs³, DEET toxicity is largely unknown. Here, we have investigated the physiological events underlying its toxicity for the nervous system of insects and mammals. By using toxicological, biochemical and electrophysiological techniques, we have shown that DEET is not simply a behaviour-modifying chemical but has potential to inhibit cholinesterase activity, in both insect and mammal preparations. Further experiments showed that DEET can synergize the toxicity of carbamates, a class of insecticides known to block acetylcholinesterase. These findings provide new elements for addressing the toxicity of DEET, alone or in combination with other chemicals, and provide useful information for the development of safer insect repellents for use in public health.

Until now, the mechanism of action and molecular targets of DEET were unknown. This gap was recently filled by Ditzen and colleagues who demonstrated that DEET blocks electrophysiological responses of olfactory sensory neurons to attractive odours in *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*⁴. These authors showed that DEET masked host odour by inhibiting subsets of heteromeric insect odorant receptors requiring the OR83b co-receptor. If these findings provided very useful information for the development of more effective repellents, there is also increasing evidence that DEET may exert more unexpected complex toxic action in insects^{5, 6}. To understand better these unexpected effects, we assessed the sensitivity of the main dengue vector *Aedes aegypti* to DEET using WHO treated-filter paper bioassays⁷. As shown in figure 1a, DEET caused dose-dependent mortality at dosages ranging from 400 to 1200 µg/cm². This corresponds to the lower range of dosages usually applied to human skin for personal protection (Fig. 1a). Indeed, formulations of DEET commercially

available range from 5% to 100% of active ingredient⁸. If it is considered that 5 ml is the average volume used to cover each human arm, people usually apply between 400 and 8000 µg/cm² of DEET to their skin⁹. Based on these findings and to isolate the intrinsic toxicity of the repellent from confounding effects resulting from insect behaviour, we carried out topical applications of DEET on the main vector of West Nile virus *Culex pipiens quinquefasciatus*. The LD₅₀ and LD₉₀ of DEET on adult females were 393.3 ± 25.4 (s.e.m) ng a.i./mg and 1103.0 ± 25.4 (s.e.m) ng a.i./mg mosquito, respectively (Fig. 1b). The amount of DEET required to kill mosquitoes was about 150 times higher than for propoxur, a carbamate insecticide known to inhibit the hydrolysis of acetylcholine (ACh) in the synaptic cleft. The slopes of the regression lines for mosquito mortality did not significantly differ between DEET (3.67 ± 0.85 ng a.i./mg, s.e.m) and propoxur (3.35 ± 0.50 ng a.i./mg, s.e.m), indicating the same heterogeneity of the mosquitoes with respect to the toxic effect of the two molecules. These results indicate that DEET not only modifies insect behaviour but also causes their mortality.

Based on these observations, we investigated the neurophysiological effects of DEET on the cercal-afferent giant-interneuron synapses in the terminal abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana* using the single-fibre oil-gap method¹⁰. DEET dissolved in physiological saline was applied at different concentrations in the preparation by superfusion into the experimental chamber. Application of DEET produced a biphasic effect on composite EPSP (cEPSP) amplitudes according to the concentration tested (0.5 and 1 µM). As illustrated in Fig. 2a, c, within the first 3 minutes, DEET (0.5 µM) produced an increase in cEPSP amplitude (113 ± 5 % s.e.m., F_{1,14}=32, p<0.0001, n=8, Fig. 2a). This effect was more pronounced with 1 µM DEET (118 ± 4 % s.e.m., F_{1,8} = 29, p<0.001, n=10, Fig. 2c). During DEET exposure, a dose-dependent decrease in cEPSP amplitude was observed to reach an amplitude lower than for controls after 25 min of application (see Fig. 2c). This biphasic effect previously observed with other classes of insecticides, such as anticholinesterasic compounds¹¹,

reflect changes in synaptic transmission activity. In other words, these results suggest that DEET may produce an elevation of the amount of ACh into the synaptic cleft through an inhibition of acetylcholinesterase (AChE EC 3.1.1.7) activity. The increase of ACh concentration after application of DEET may then be sufficiently high to activate a negative feed back inhibition of ACh release through the presynaptic muscarinic receptors^{11, 12}. To check this assumption, we carried out additional experiments in the presence of atropine which is known to block muscarinic receptors in the synaptic transmission of cockroaches¹². As shown in Fig. 2b,d, pre-treatment with atropine (1 μ M) for 10 minutes counteracted the cEPSP depression observed with DEET applied at 0.5 and 1 μ M (for comparison see Fig. 2 a,c). Under this experimental condition, DEET produced only a dose-dependent increase in cEPSP amplitude, thus confirming the participation of presynaptic muscarinic receptors in the modulation of ACh release in synapses. It is interesting to note that application of DEET (0.5 μ M) on synaptic preparations, pre-treated with 1 μ M atropine for 10 minutes, increased both cEPSP and unitary EPSP amplitudes, which are known to result from the spontaneous activity of presynaptic cercal mechanoreceptors (Fig. 2e,f). This accumulation of acetylcholine in the synaptic cleft indicates that ACh is not efficiently hydrolyzed by AChE in the presence of DEET.

Additional electrophysiological recordings were also performed on isolated mouse phrenic-hemidiaphragm muscles. We revealed that high concentration of DEET (500 μ M) was needed to prolong about 2 fold the decay time constant of both synaptic potentials and currents (Fig. 2g). This prolongation of the time course of synaptic potentials or currents, known to occur after AChE inhibition^{13, 14}, or absence of AChE expression¹⁵, is due to the lack of ACh hydrolysis, allowing ACh to persist in the synaptic cleft, and to activate endplate nicotinic ACh receptors repetitively. It should be noted that far higher concentrations of DEET were required

to get a prolongation of the decay time constant of synaptic events on mouse neuromuscular preparation compared to insect neurons.

Considering these results, we compared the effect of DEET on the activity of two purified AChE , one from an insect (*Drosophila melanogaster*, DmAChE) and the other from humans (HuAChE). DEET (from 1 to 10 mM) was found to inhibit the hydrolysis of ACh by AChEs . This inhibition was reversible since pre-incubation of the enzyme with DEET did not change the extent of inhibition. Furthermore, dilution of the inhibited enzymes restored enzyme activity. Incubation of each enzyme with substrate and DEET resulted in a reduced enzyme activity (Fig. 3a & 3c). Propoxur may be considered as a hemi substrate of AChE since it enters into the site, carbamoylates the serine which does not significantly reactivate in the first 10 min following application. DEET was found to protect AChE from carbamoylation by propoxur. At high concentrations, protection by DEET is total (Fig. 3b & 3d).

The kinetics of substrate hydrolysis by AChE was complex due to the fact that the active site is buried 20 Å inside the protein (see supplementary information for details, Fig S1). Simultaneous kinetic analyses of inhibition of AChE or butyrylthiocholine hydrolysis and carbamoylation allowed us to estimate binding constants of DEET for the two substrate binding sites of cholinesterases (Supplementary information, Table S1). Binding of DEET at the peripheral site, located at the entrance of the active site gorge, was estimated to be 1.02 mM (\pm 0.03) and 8.39 mM (\pm 6.97) for DmAChE and HuAChE, respectively. Binding of DEET at the catalytic site located at the bottom of the active site gorge was not necessary to describe inhibition of DmAChE and was estimated as 5 \pm 3.7 mM for HuAChE. Thus, DEET would enter into the active site gorge of HuAChE but not into the gorge of DmAChE, resulting in a stronger inhibition of the human enzyme. This hypothesis was consistent with structural data showing the active site gorge of DmAChE about 50% narrower than the active site of HuAChE¹⁶. DEET was also found to be an inhibitor of human plasma butyrylcholinesterase

(HuBChE, EC 3.1.1.8) (Fig. 3e). As the active site of HuBChE was widely open with a low affinity peripheral site, the optimum activity was shifted to the higher concentration range. Thus DEET can enter the gorge and hinder the substrate at both binding sites. To check whether the accommodation and binding of DEET was possible inside the active site of vertebrate AChE, it was docked as a tetrahedral adduct on the catalytic serine of human AChE crystal structure (1B41). Minimal adaptation of the side chains of adjacent residues in the active side of HuAChE suggests the accommodation of DEET in a catalytic site was possible (Fig. 3f).

Considering that DEET may be a potent inhibitor of AChE in both insects and mammals, we then investigated its potential interaction with carbamates. In the mosquito *Cx. quinquefasciatus*, topical applications were carried out with a range of DEET doses combined with a range of propoxur doses. Our results were not well described by a model based on the hypothesis of an additive effect for the two compounds. As shown in the Fig 4a, mosquito mortality was higher than expected. Several models of interactions between the two chemicals were subsequently tested. The best fit took into account an interaction involving the effect of DEET on the insecticidal effect of propoxur, as follows (Fig. 4b):

$$ED_{propoxur} = D_{propoxur} + ic * D_{propoxur} * D_{DEET}$$

$$ED_{DEET} = D_{DEET}$$

where ED is the effective dosage, D the dosage and ic the interaction coefficient. The interaction coefficient, ($ic = 3.07 \pm 0.98$) was significantly higher than 0, indicating that DEET synergised propoxur toxicity.

The toxic interactions between DEET and propoxur were then investigated at synaptic level in the cockroach *P. americana*. Two different experimental conditions were used. As illustrated in Fig. 4c, synaptic preparations were pre-treated with propoxur (100 nM) for 10 minutes. The

combined effect of propoxur and DEET co-exposure was then tested at two different concentrations of DEET (i.e., 0.5 μ M and 1 μ M). As shown in Fig. 4d, co-application of 100 nM propoxur and 0.5 μ M DEET did not further increase cEPSP amplitude, relative to cEPSP amplitude measured when 100 nM propoxur was applied alone. The additive effect on cEPSP amplitude was only observed using mixture of propoxur and a higher concentration of DEET (i.e., 1 μ M). This was confirmed when synaptic preparations were pre-treated with DEET (0.5 μ M) for 10 min. In this case, 1 μ M DEET and 0.1 μ M propoxur co-exposure did not produce an additional effect on cEPSP amplitude relative to cEPSP amplitude measured when 0.1 μ M DEET was applied alone (Fig. 4d).

Interestingly, when neostigmine (3 μ M) was perfused on mouse isolated phrenic-hemidiaphragm muscles, in the continuous presence of 500 μ M DEET, the decay time constant of synaptic responses was about 3 fold more prolonged than with DEET alone (Fig. 4 e,f). These results indicated that DEET (i) had an inhibitory action on AChE in mouse hemidiaphragm endplates that was not maximal at the (high) concentration used, (ii) did not prevent subsequent action of neostigmine on endplate AChE, and (iii) was less active, on equimolar basis, than neostigmine in mouse hemidiaphragm junctions.

Previous studies have already reported synergistic interactions between DEET and other chemicals, particularly cholinesterase inhibitors (propoxur, pirimiphos-methyl, piridostigmine Bromide (PB)) for cockroaches and mosquitoes^{5, 17, 18}. In adult hens, Abou-Donia et al.¹⁹ demonstrated that co-exposure to sub-neurotoxic doses of PB and DEET resulted in increased toxicity characterized by neurologic dysfunction and neuropathologic lesions. In the central cholinergic system of rats, application of physiologically relevant doses of PB and DEET, alone or in combination, led to neurobehavioral deficits and region-specific alterations in AChE and nicotinic receptors²⁰. Knowing that US military troops based in Iraq during the first Gulf War used >75% DEET in ethanol on their skin²¹, evidence for the inhibition of human

AChE and BChE by DEET is of great concern and lead to the suspicion that combined exposure to DEET and PB may have played a role in the unexplained illnesses that many veterans have suffered.²²⁻²⁴ More investigations are urgently needed to confirm or dismiss the potential toxicity to humans arising from the combined use of different cholinesterase inhibitors.

METHOD SUMMARY

DEET insecticidal properties

Biological materials. The standard susceptible strains “S-Lab” of *Culex quinquefasciatus* and “Bora” of *Ae. aegypti* were used in bioassays. These two strains have been colonized for many years in laboratory and are free of any detectable insecticide resistance mechanisms.

Bioassays.

Topical applications. Topical solutions were first prepared by dissolving technical grade DEET and propoxur in acetone. For each compound, five to eight doses were used to provide a range of mortality from 0% to 100%. Two-to-5-day-old non-blood-fed females of *Cx. quinquefasciatus* were first anaesthetised by extended contact with carbon dioxide then placed on a refrigerating plate at 4 °C to maintain anaesthesia during manipulation (see ref. 10). A total of 50 susceptible females were used for each dose of insecticide. A volume of 0.1 µl of insecticide solution (at the required concentration) was deposited on the upper part of the pronotum of females using a micro-capillary. Fifty females receiving a volume of 0.1 µl pure acetone served as controls. After each test, females were transferred into plastic cups and provided with 10% honey solution on cotton wool and held for 24 h at 27 °C and 80% relative humidity. Mortality rates were recorded 24 h after tests. Data were analysed with the program GOSA (www.bio-log.biz) using the statistical approach according to Finney²⁵. Mortality (y) as a function of DEET dosage (x) was fitted to the cumulative Gauss function and is expressed in nanograms of insecticide per milligram of female weight.

$$y = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^x e^{-u^2} du \quad \text{where} \quad u = (\log(x) - \log(LD50)) * \text{slope}$$

Treated filter papers bioassay. Mortality resulting from tarsal contact with treated filter paper was measured using WHO test kits⁷ against adult females of *Ae. aegypti*. Four Batches of 25 non blood-fed females, two-five days old, were introduced into holding tubes and kept for a settling period of 60 min. They were then transferred to exposure tubes, which were held vertically for 60 minutes under subdued light. Mortality was recorded 24 h after exposure. Each solution was tested four times and each test was replicated three times with different batches of insects to take into account inter-batch variability.

Electrophysiology.

Adult male cockroaches *Periplaneta americana* were pinned dorsal side up in a dissection dish and dorsal cuticles were removed to allow access to the ventral nerve cord. The Terminal Abdominal Ganglion (TAG) with the nerve cord were then carefully dissected with the aid of a binocular microscope and placed in normal cockroach saline containing (in mM): NaCl 208, KCl 3.1, CaCl₂ 10, sucrose 26, HEPES 10; pH was adjusted to 7.2 with NaOH. The synaptic preparation was composed of a cercus, the corresponding cercal nerve XI, the de-sheathed TAG (containing the studied synapse) and the abdominal part of the nerve cord. Electrophysiological recordings of synaptic events were obtained using the single-fibre oil-gap method¹⁰. With this technique it is possible to record unitary excitatory postsynaptic potentials (uEPSP) resulting from the activity of presynaptic cercal mechanoreceptors. In addition, composite excitatory postsynaptic potentials (cEPSP) were also triggered in response to short electrical pre-synaptic stimulation applied at a frequency of 0.1 Hz to the ipsilateral cercal nerve XI. During experiments, the resting potential was continuously monitored on a pen chart recorder. The uEPSPs and cEPSPs were recorded using a Hameg oscilloscope and stored on PC computer with Hameg software. Experiments were carried out at room temperature (20°C). Data were expressed as mean \pm S.E.M. when quantified. Electrophysiological data were analysed for statistical significance using an Analysis of Variance (one-way ANOVA) followed by a post-hoc Tukey test. Differences among data were judged significant when p<0.05. Data analysis was performed using STATISTICA (StatSoft, Cracow, Poland).

In all electrophysiological experiments, DEET and propoxur were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO, stock solution 10 mM) and absolute ethanol (stock solution 10 mM), respectively. Final dilutions contained at most 0.1 % DMSO and absolute ethanol. These concentrations of solvents were found to have no effect on synaptic transmission. All compounds were purchased from Sigma Chemicals (L'isle d'Abeau Chesnes, France) and propoxur was bought from Bayer AG (Leverkusen, Germany.).

All experiments on mice were performed in accordance with French and European Community guidelines for laboratory animal handling. Adult male Swiss-Webster mice (20-25 g body weight) purchased from IFFA CREDO (Saint Germain sur l'Arbresle, France) were anesthetized with Isoflurane (AErrane®, Baxter S.A., Lessines, Belgium) inhalation, and euthanized by dislocation of the cervical vertebrae followed by immediate exsanguination. The left mouse hemidiaphragm with its associated phrenic nerve was dissected out from the animal and mounted in a silicone-lined organ bath (4 ml volume). Isolated preparations were perfused with standard Krebs-Ringer solution of the following composition: 154.0 mM NaCl, 5.0 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 5.0 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), and 11.0 mM glucose. The solution gassed with pure O₂ had a pH of 7.4.

Electrophysiological recordings on isolated phrenic-hemidiaphragm muscles were performed using conventional techniques¹⁹. Briefly, membrane and synaptic potentials were recorded from endplate regions, at room temperature (22°C), with intracellular microelectrodes filled with 3 M KCl (8-12 MΩ resistance), or with extracellular microelectrodes (filled with Krebs-Ringer solution, 1-3 MΩ resistance) using conventional techniques¹⁹, and an Axoclamp-2A system (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). Electrical signals after amplification were displayed on a digital oscilloscope, collected and digitized at a sampling rate of 25 kHz with the aid of a PC computer and a Digidata 1322A unit (Axon Instruments). Computerized data acquisition and analysis was performed with the program WinWCP (V3.8), kindly provided by Dr. John Dempster (University of Strathclyde, Strathclyde, Scotland). The motor nerve of isolated neuromuscular preparations was stimulated via a suction microelectrode, adapted to the diameter of the nerve, with square wave pulses of 0.1 ms duration, generated by a S-44 stimulator (Grass Instruments, AstroMed, W. Warwick, RI, USA), and supramaximal intensity (typically 3-8 V). Studies on nerve-evoked endplate potentials (EPPs) were performed in standard physiological solution containing 1.6 μM μ-conotoxin GIIIB (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) to block voltage-dependent sodium channels of skeletal muscle fibres²⁶. The amplitudes of full-sized EPPs and MEPPs recorded on junctions treated with μ-conotoxin GIIIB were normalized to a membrane potential of -75 mV. Miniature endplate potentials (MEPPs) and EPPs were analyzed individually for amplitude and time course. For each condition studied, four to six individual experiments were performed and the results were averaged to give the presented mean ± S.E.M. The statistical significance of differences between controls and test values was assessed with Student's t-Test (two-tailed), or the Kolmogorov-Smirnov two-sample test. Differences were considered significant if *P* < 0.05.

Biochemistry

Drosophila melanogaster AChE (Dm-AChE) was produced in the baculovirus system and purified as previously described²⁷. The native human AChE and BChE used for kinetic studies were from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

Hydrolysis of ACh iodide was measured spectrophotometrically at 412 nm by the Ellman method²⁸ at 25°C, in 25 mM phosphate buffer, pH 7. Substrate concentrations were 4 µM-200 mM, with a minimum of 5 repetitions per concentration. Activity was followed for 1 min after addition of the enzyme to the mixture and spontaneous hydrolysis of the substrate was subtracted.

Rates of carbamoylation were estimated by incubation of AChEs with various concentration of propoxur for different periods of time. The remaining activity was measured for 30 sec following 10 fold dilutions in Ellman reaction medium supplemented with 1 mM acetylthiocholine.

Data were analysed using the model and equation of Stojan and colleagues²⁹ for ATCh hydrolysis inhibition and using the model of pseudo first order irreversible inhibition for carbamoylation rate (see complementary information Fig. 1SA). Fits were performed simultaneously on both equations by multiple non-linear regressions using the program GOSA (www.bio-log.biz).

The accommodation and binding of DEET inside the active site of Hu-AChE was made by building a 3D structure of DEET using MOLDEN, a processing program of molecular and electronic structure and then optimized quantum mechanically *in vacuo* by Gaussian 03, an electronic structure program. For the calculation we used 6-31g* basis set at the Hartree-Fock level. For molecular mechanics energy and dynamic calculations we assigned atomic types for the DEET molecule already existing in the CHARMM distribution C27n1 topology file. Charges were calculated by Mullikan's approximation and the missing parameters were searched until a satisfactory fit of the model to the *ab initio* energy potentials and geometry was obtained. In the next step we manually docked the DEET in the active site above the catalytic serine (S203) of the HuAChE molecule: the appropriate 3 atoms of DEET were superimposed on the corresponding atoms of substrate analogue molecule situated in the active site of torpedo AChE (PDB code 2C5F) with the carbonyl oxygen pointing into the oxyanion hole. The structure was then fully relaxed without moving any of the protein atoms. Finally, our 3D model of HuAChE and docked DEET was subjected to two successive 50 step QMMM refinements, assigning the DEET molecule, catalytic serine (S203) and histidine (H447) quantum mechanically (49 QM atoms and 2 link atoms), while the rest of protein and

water molecules (193 of them) were treated mechanically. During QMMM relaxation of the complex between HuAChE and the DEET molecule, the latter was accommodated in a tetrahedral adduct conformation.

REFERENCES

1. Fradin, M. S. & Day, J. F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N Engl J Med* 347, 13-8 (2002).
2. Fradin, M. S. Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. *Ann Intern Med* 128, 931-40 (1998).
3. Rowland, M. et al. DEET mosquito repellent provides personal protection against malaria: a household randomized trial in an Afghan refugee camp in Pakistan. *Trop Med Int Health* 9, 335-42 (2004).
4. Ditzén, M., Pellegrino, M. & Vosshall, L. B. Insect odorant receptors are molecular targets of the insect repellent DEET. *Science* 319, 1838-42 (2008).
5. Pennetier, C., Corbel, V. & Hougard, J. M. Combination of a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling knockdown-resistant mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 72, 739-44 (2005).
6. Licciardi, S., Herve, J. P., Darriet, F., Hougard, J. M. & Corbel, V. Lethal and behavioural effects of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) on *Aedes aegypti* mosquitoes in laboratory assays. *Med Vet Entomol* 20, 288-93 (2006).
7. WHO (ed.) Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs). (2006).
8. Xue, R. D., Ali, A. & Day, J. F. in *Insect Repellents: Principles, Methods and Uses* (eds. Debboun, M., Frances, S. P. & Strickman, D.) (CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007).
9. Costantini, C., Badolo, A. & Ilboudo-Sanogo, E. Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afrotropical vector mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98, 644-52 (2004).
10. Hue, B. & Callec, J. J. in *Cockroaches as models for neurobiology: applications in biochemical research.* (eds. Huber, I., Masler, E. P. & Rao, B. R.) 149-168 (CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1990).
11. 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*, 1-12. (2006).
12. Hue, B., Lapiède, B. & Malecot, C. Do presynaptic muscarinic receptors regulate acetylcholine release in the central nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*? *J Exp Biol* 142, 447-451 (1989).
13. Katz, B. & Miledi, R. The binding of acetylcholine to receptors and its removal from the synaptic cleft. *J Physiol* 231, 549-74 (1973).
14. Van der Kloot, W., Balezina, O. P., Molgo, J. & Naves, L. A. The timing of channel opening during miniature endplate currents at the frog and mouse neuromuscular

- junctions: effects of fasciculin-2, other anti-cholinesterases and vesamicol. *Pflugers Arch* 428, 114-26 (1994).
15. Minic, J., Chatonnet, A., Krejci, E. & Molgo, J. Butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase activity and quantal transmitter release at normal and acetylcholinesterase knockout mouse neuromuscular junctions. *Br J Pharmacol* 138, 177-87 (2003).
 16. Harel, M. et al. Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Sci* 9, 1063-72 (2000).
 17. Moss, J. I. Synergism of toxicity of N,N Diethyl m toluamide to German Cockroaches (Orthoptera: Blattelidae) by Hydrolytic Enzyme Inhibitors. *Journal of Economical Entomology* 89, 1151-1155 (1996).
 18. Pennetier, C. et al. Synergy between repellents and non-pyrethroid insecticides strongly extends the efficacy of treated nets against *Anopheles gambiae*. *Malar J* 6, 38 (2007).
 19. Abou-Donia, M. B. et al. Increased neurotoxicity following concurrent exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and chlorpyrifos. *Fundam Appl Toxicol* 34, 201-22 (1996).
 20. Abou-Donia, M. B. et al. Locomotor and sensorimotor performance deficit in rats following exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin, alone and in combination. *Toxicol Sci* 60, 305-14 (2001).
 21. GAO. GULF WAR ILLNESSES: DOD's Conclusions about U.S. Troops' Exposure Cannot Be Adequately Supported (ed. Department_of_Defence) (United States General Accounting Office, 2004; <http://www.gao.gov/new.items/d04159.pdf>; 116pp).
 22. Haley, R. W. & Kurt, T. L. Self-reported exposure to neurotoxic chemical combinations in the Gulf War. A cross-sectional epidemiologic study. *Jama* 277, 231-7 (1997).
 23. Haley, R. W., Kurt, T. L. & Hom, J. Is there a Gulf War Syndrome? Searching for syndromes by factor analysis of symptoms. *Jama* 277, 215-22 (1997).
 24. Chaney, L. A., Wineman, R. W., Rockhold, R. W. & Hume, A. S. Acute effects of an insect repellent, N,N-diethyl-m-toluamide, on cholinesterase inhibition induced by pyridostigmine bromide in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 165, 107-14 (2000).
 25. Finney, D. *Probit Analysis* (Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1971).
 26. Cruz, L. et al. Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels. *J Biol Chem* 260, 9280-9288 (1985).
 27. Chaabihi, H. et al. Biochemical characterization of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase expressed by recombinant baculoviruses. *Biochem Biophys Res Commun* 203, 734-42 (1994).
 28. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr. & Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88-95 (1961).
 29. Stojan, J., Golicnik, M. & Fournier, D. Rational polynomial equation as an unbiased approach for the kinetic studies of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase reaction mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1703, 53-61 (2004).

Acknowledgements. We thank J. Bonnet for his technical assistance and P. Agnew for a critical review of this manuscript. V.C. & J.M.H are supported by the Institut de Recherche pour le development (IRD). C.P. is supported by the French ministry of Foreign Offices (SCAC) and the Foundation de France fellowship (Francois Lacoste, Fondation de France). BL. is supported by the University of Angers. D.F. and M.D. are supported by the

University of Toulouse (Paul Sabathier). J.S. is supported by the University *Ljubljana*. M.S. is supported by the Copernicus University. E.G. and J.M. are supported by the Centre Nationale de la Recherche Scientifique (CNRS). This study was financially supported by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR, program REAC SEST06 030 01).

Author Contributions V.C., D.F., C.P. and B.L. designed the experiments and wrote the paper. J.M.H conducted the toxicological experiments on mosquitoes; M.S. performed the electrophysiological studies on cockroaches; D.F. and M.D. carried out the biochemical studies on insect and human purified cholinesterases; J.S. modelled the binding of DEET into the active site of human ACHE; E.G. and J.M. conducted the electrophysiological experiments on mouse neuromuscular junctions. All authors discussed the results and contributed to the text and statistical analyses.

Author Information The authors declare no competing financial interests. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.C. (Vincent.corbel@mpl.ird.fr), B.L. (bruno.lapied@univ-angers.fr) or D.F. (Didier.Fournier@ipbs.fr)

Figure Legends

Figure 1: Insecticidal effect of DEET.

The log dose curves follow the formula:

$$u = (\log(x) - \log(LD_{50})) * slope ,$$

$$y = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^x e^{-u^2} du ,$$

where x is the dose of DEET and y the mortality rate.

- a)** Mortality rate among *Aedes aegypti* exposed for 1 h to paper impregnated with DEET in WHO bioassays. Dosages applied on paper were compared with standard skin applications of commercially available formulations containing DEET (lower and upper DEET formulation concentrations 5 to 100% were taken from the review of Xue et al.⁸). DEET formulation concentrations (%) were converted to dosages ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) based on 5 ml being the average volume required to cover a human arm⁹. The figure showed that the dosages used on skin (400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ to 8000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) are equivalent or much greater than dosages showing insecticidal properties in the case of close contact ($LD_{50}= 830 \pm 30 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, s.e.m; $LD_{95}= 1,180 \pm 50$ s.e.m).
- b)** Log dose intrinsic insecticidal effect of DEET on *Culex quinquefasciatus* S-Lab. The median (50) and 90 effective dosages were $393.3 \pm 50.8 \text{ ng DEET / mg mosquito}$ (s.e.m) and $1103.0 \pm 122.3 \text{ ng DEET / mg mosquito}$ (s.e.m). For comparison, the LD_{50} and LD_{90} of propoxur (carbamate) were $2.6 (\pm 0.2)$ and $10.5 (\pm 1.6) \text{ ng a.i./ mg female}$, respectively.

Figure 2: Effects of DEET on insect and mammalian synaptic transmission.

- a) & c)** Histograms illustrated the EPSP amplitudes (% of control) relative to time (min) after exposure to 0.5 and 1 μ M of DEET in *P. americana*. DEET induced a bi-phasic effect on cEPSP amplitude which is more marked at the highest concentration (EPSP amplitudes increase to $118 \pm 4\%$ (s.e.m.) of the control 3 min following application of DEET 1 μ M and then decrease to $77 \pm 6\%$ (s.e.m.) after 5 min).
- b) & d)** The second set of experiments were performed after pre-treatment with atropine (i.e. a specific muscarinic receptor inhibitor). Results showed that DEET at 0.5 μ M increased the EPSP amplitude to $131 \pm 3\%$ ($F_{1,48} = 23$, $p<0.0001$, $n=10$) and to $140 \pm 8\%$ ($F_{1,46} = 38$, $p<0.00001$, $n=10$) after 10 and 30 minutes, respectively. Atropine abolished the decrease of EPSP amplitudes observed in a) & c), indicating the activation of a negative feedback resulting from the activation of pre-synaptic muscarinic receptors.
- e) & f)** Typical examples of uEPSPs and cEPSPs recorded after DEET application versus time in cockroaches.
- g)** Effect of DEET on the time course of full size endplate potentials recorded in mouse hemidiaphragm preparations. EPPs recorded under control conditions (trace 1), and after the addition of 500 μ M DEET to the medium (trace 2). Note the prolongation of the decay phase of EPPs with DEET with little change in the amplitude and time to peak.

Figure 3: Effects of DEET on insect and human cholinesterase enzymatic activities

- a)** Inhibition of ACh hydrolysis by *Drosophila melanogaster* (Dm) AChE (v/Et) by DEET at various substrate concentrations (AcetylThioCholine or ATCh).
- b)** The effect of increasing DEET concentration on the second order rate constant for the carbamoylation of DmAChE by propoxour.
- c)** Inhibition of ACh hydrolysis by human AChE (v/Et) by DEET at various substrate concentrations (ATCh).
- d)** The effect of increasing DEET concentration on the second order rate constant for the carbamoylation of Hu-AChE by propoxur.
- e)** Inhibition of butyrylthiocholine hydrolysis by human BChE (v/Et) by DEET at various substrate concentrations (BCh).
- f)** The picture was created by VMD, a Visual Molecular Dynamics program (cite). After QMMM relaxation of the complex between huAChE and a DEET molecule, the latter was accommodated in a tetrahedral adduct conformation. Minimal adaptation of the side chains of adjacent residues in the active site of huAChE suggests that the accommodation of DEET in a position favourable for enzymatic hydrolysis is possible.

Figure 4: Interactions between DEET and the anti-AChE compound, propoxur

- a) & b)** Toxic interactions between DEET ($\mu\text{g}/\text{mg}$ mosquito) and propoxur ($\mu\text{g}/\text{mg}$ mosquito) for *Cx. quinquefasciatus* by topical application. Two models were fitted to our data. The model including a synergistic interaction provided a better description of the data than the model based on additive effects.
- c) & d)** Effects of DEET and propoxur on cEPSP amplitudes in *P. Americana* after 20 min. Two different experimental conditions were used for studying interactions

between DEET and propoxur in the synaptic cleft (pre-treatment of propoxur followed by application of DEET and *vice versa*). Application of DEET (0.5 and 1 μ M) after a pre-treatment of propoxur (100nM) potentiated the increase of cEPSP amplitude induced by the carbamate (increases in EPSP were 122 \pm 5% for propoxur alone, 130 \pm 4 % for propoxur + DEET 0.5 μ M and 141 \pm 6% for propoxur + DEET 1 μ M). In contrast, the application of propoxur (100nM) after pre-treatment of DEET (0.5 and 1 μ M) did not potentiate the increase of cEPSP induced by DEET (increases of EPSP amplitude were 131 \pm 3% and 130 \pm 4% for DEET 0.5 μ M alone and DEET 0.5 μ M + propoxur, respectively, and 140 \pm 8% and 141 \pm 6% for DEET 1 μ M alone and DEET 1 μ M + propoxur, respectively).

e) & f) Effect of DEET and neostigmine on the time course of full size endplate potentials recorded in mouse hemidiaphragm preparations. Mean values (\pm s.e.m) of the half-decay time of EPPs under control conditions (gray column), 500 μ M DEET (black column) and in the continuous presence of DEET and 3 μ M neostigmine (white column). * denote significant different from control $P < 0.001$. Examples of full size EPPs in response to a single or paired nerve stimuli, either in the presence of 500 μ M DEET or in the presence of DEET and 3 μ M neostigmine. Note the marked prolongation of the decay phase of EPPs in the presence of DEET and neostigmine. * denote significant different from control $P < 0.001$. All data was obtained in mouse hemidiaphragm junctions that have been treated with 1.6 μ M μ -conotoxin GIIIB to block action potentials in muscle fibres.

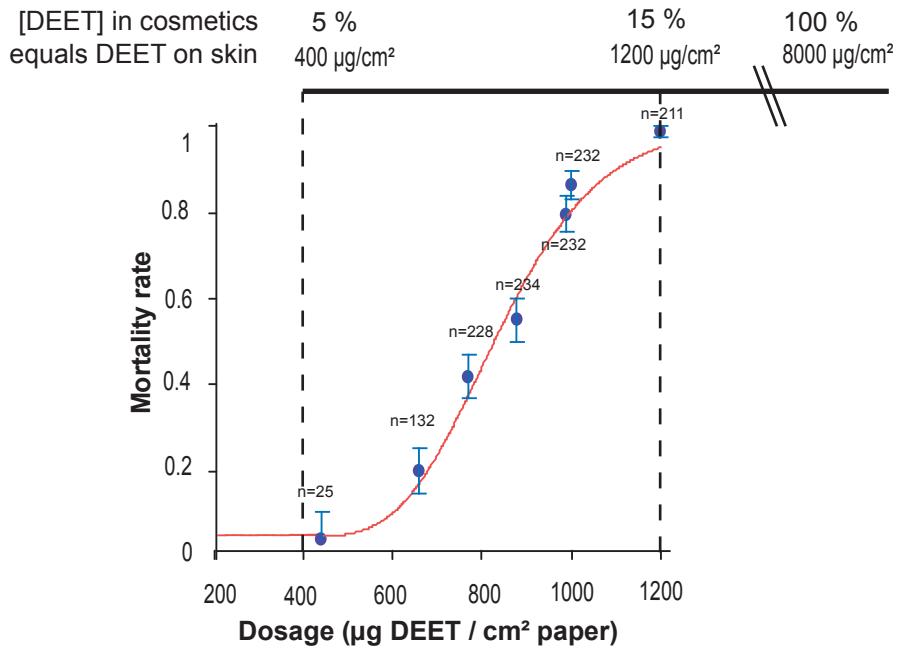
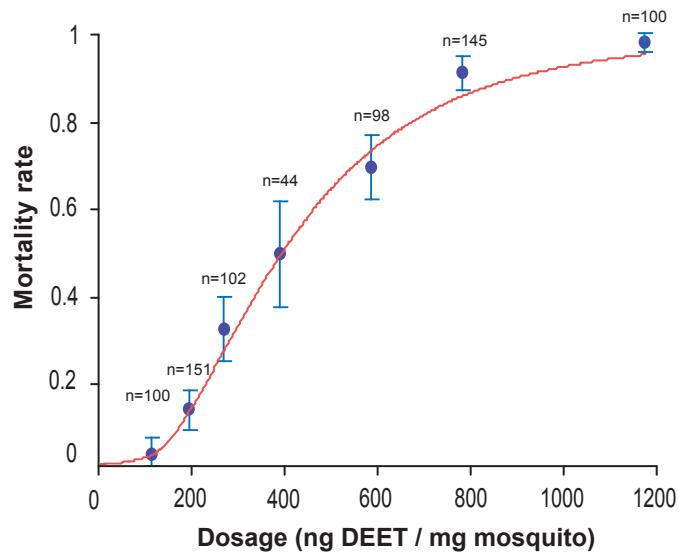
A**B**

figure 1 (Corbel et al)

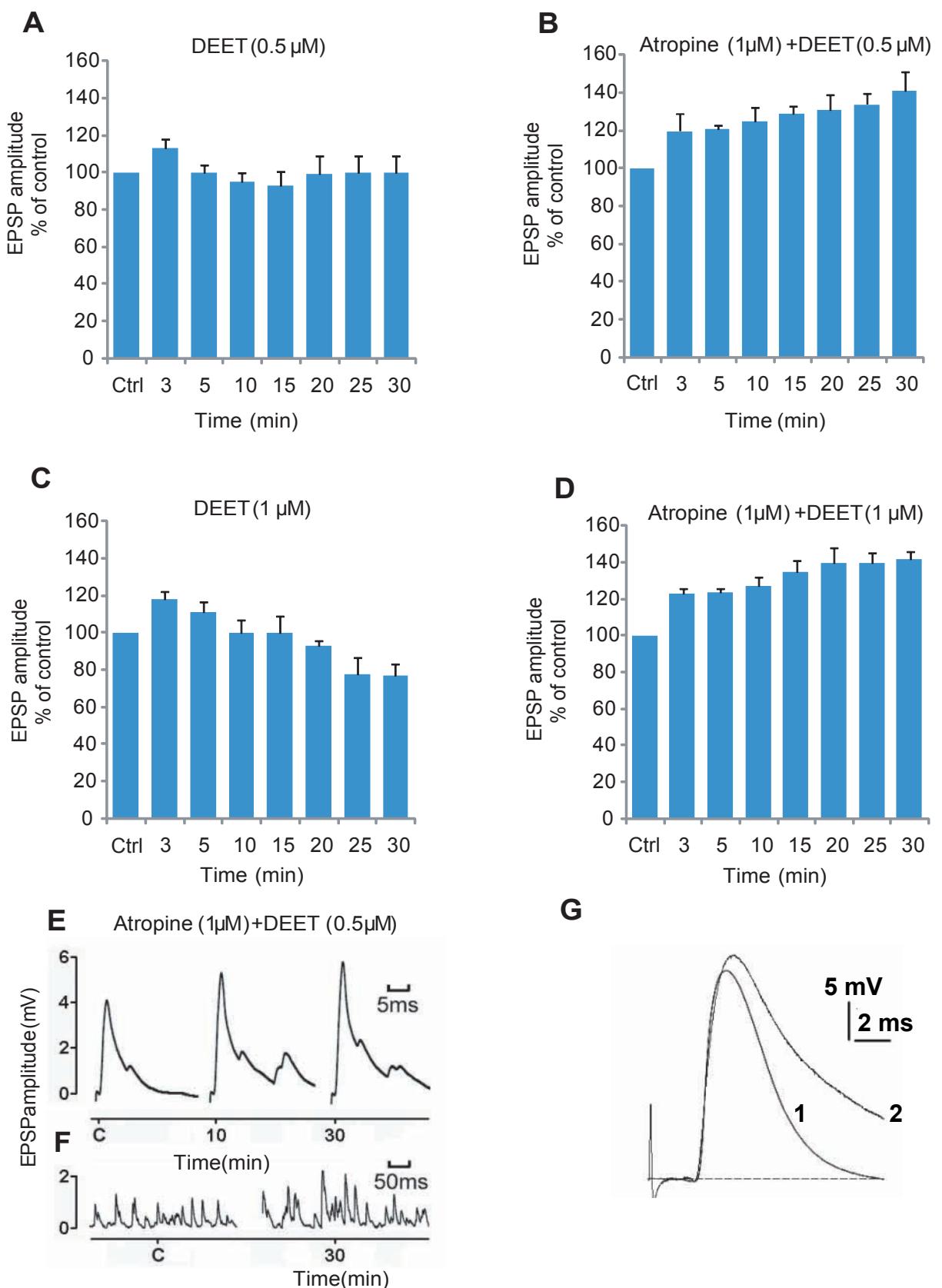
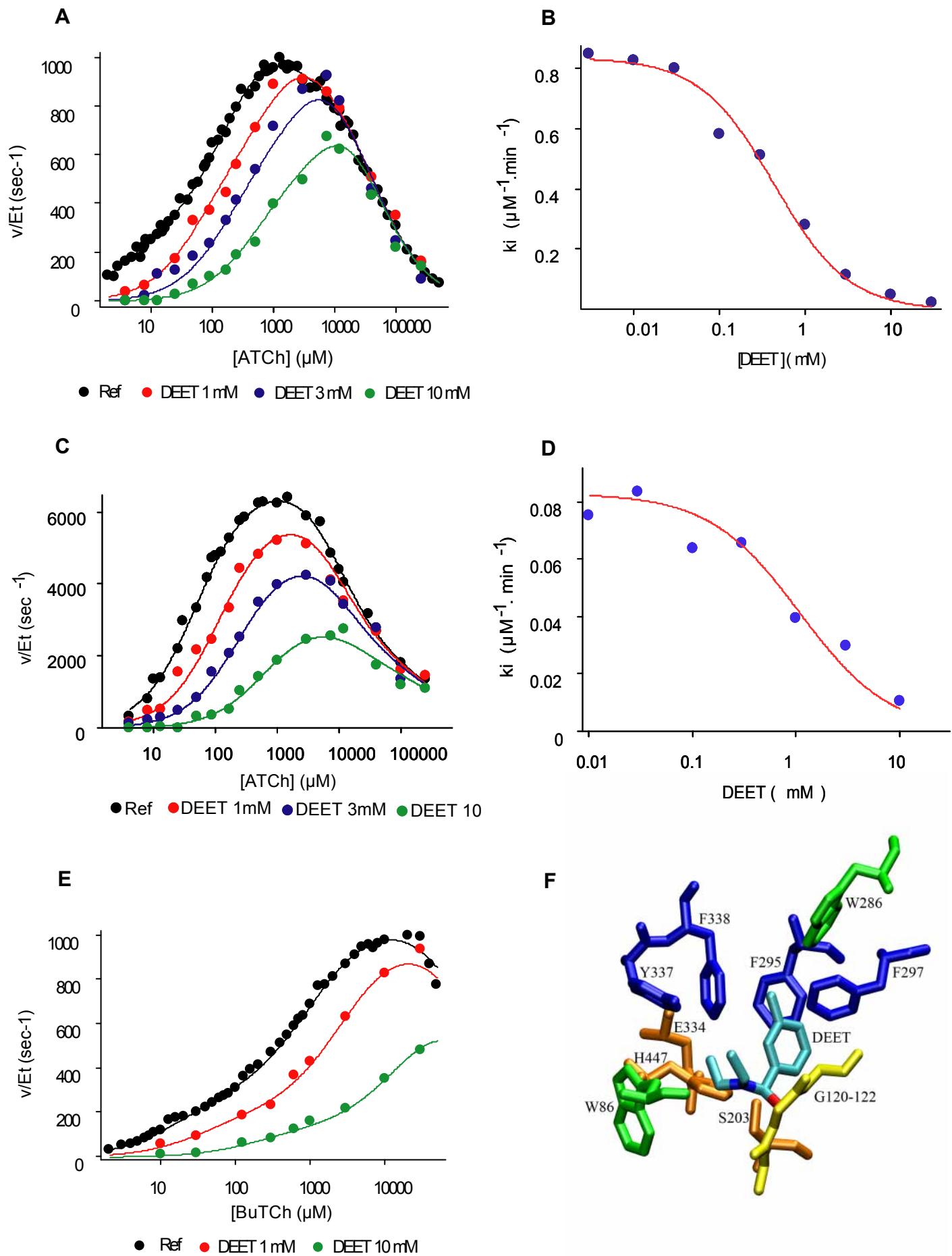


figure 2 (Corbel et al)



¹⁵⁷
figure 3 (Corbel et al)

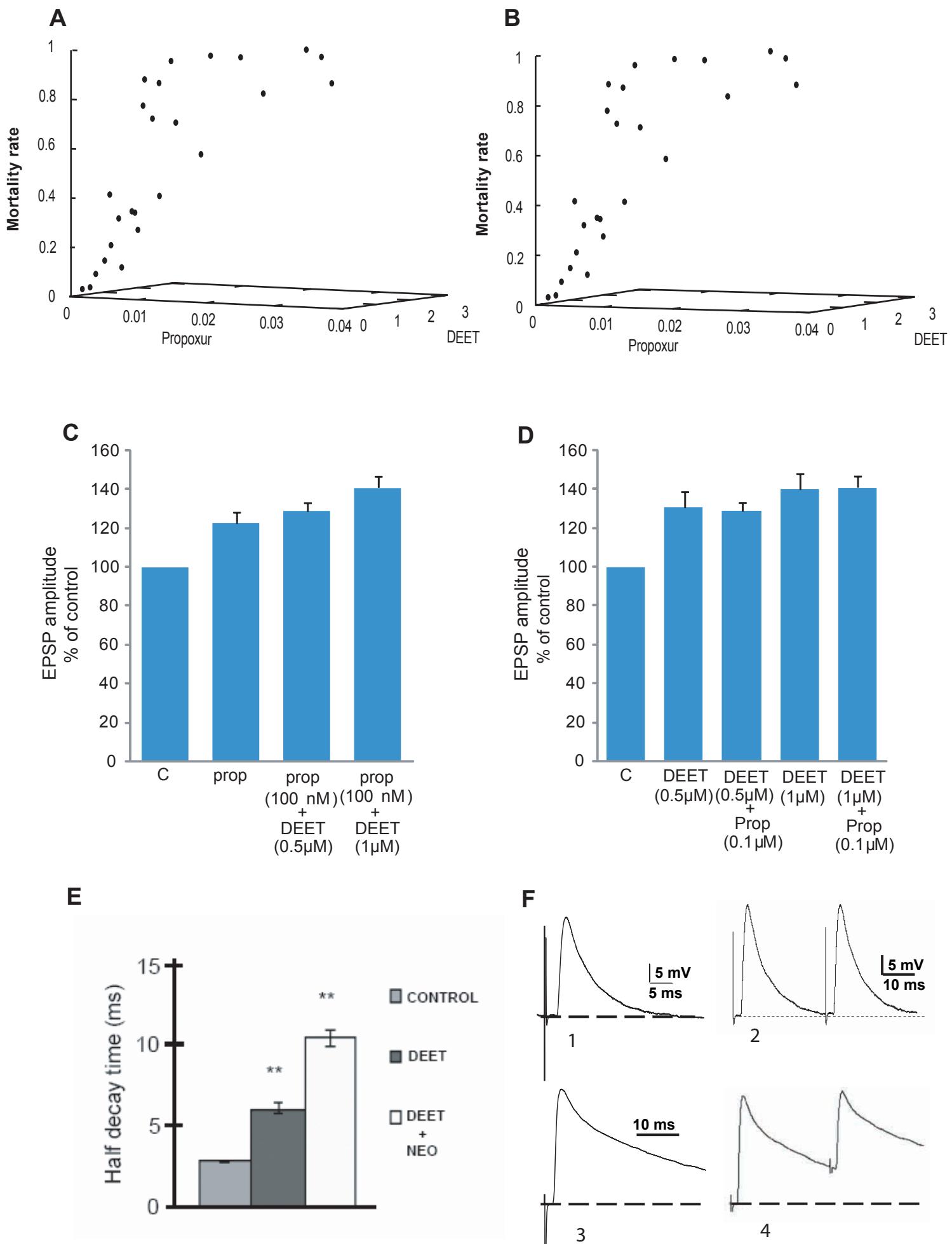


figure 4 (Corbel et al)

Article 7: article en préparation (en français)

The insect repellent DEET exerts neurotoxic effects through an elevation of intracellular calcium concentration in pacemaker insect neurosecretory cells

Pennetier C, Gautier H, Corbel V, Hougard J-M & Lapiel B

The insect repellent DEET exerts neurotoxic effects through an elevation of intracellular calcium concentration in pacemaker insect neurosecretory cells

Cédric Pennetier¹, Hélène Gautier², Vincent Corbel³, Jean-Marc Hougard¹ and Bruno Lapiel²

¹ Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et Centre de Recherche Entomologique de Cotonou (CREC), Cotonou, Bénin

² Laboratoire Récepteurs et Canaux Ioniques Membranaires (RCIM), UPRES EA 2647, USC INRA, Université d'Angers, Angers, France

³ Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles (LIN), Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France

Abstract

Many biting insects are able to transmit diseases or are regarded as pests. In this case, the first line of defence against insect vectors is the use of personal protective measures such as insecticide-treated clothing or net. The use of repellents is one personal protection measure to avoid to be bitten. One of the most widely used and reliable insect repellent for this purpose is the N,N-diethyl-m-toluamide (DEET). However, although the efficacy of DEET is confirmed, the precise mode of action of this repellent against insect seems to remain elusive. Consequently, we have performed experiments at the insect central nervous system level to understand better the neurotoxic effect of DEET. External application of DEET onto cockroach *Periplaneta americana* neurosecretory cell bodies maintained in short term culture induces a depolarization-dependent elevation of intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$). The calcium rise is abolished following treatment with calcium-free solution, indicating the participation of external calcium. The use of different blockers, ω -conotoxin (HVA calcium channel blocker), LOE-908 (NCCE inhibitor) and ryanodine (internal store receptor inhibitor), have allowed to determine the molecular events underlying this neuronal neurotoxic effect. These results clearly demonstrate a neurotoxic effect of DEET in the insect central nervous system via an elevation of $[Ca^{2+}]_i$, which thereby alter neuronal functions.

Introduction

L'étude du mode d'action du DEET s'inscrit dans un axe de recherche plus global qui vise à caractériser les mécanismes physiologiques sous-jacents à la perturbation du comportement induites par les répulsifs. Néanmoins, le DEET a montré des propriétés toxiques contre les moustiques lors de l'étude préliminaire en laboratoire, ce qui confirme plusieurs récentes publications (Pennetier *et al* 2005; Licciardi *et al* 2006; N'Guessan *et al* 2006). Nous avons donc orienté nos recherches sur les effets du DEET sur le système nerveux central (SNC) d'un insecte la blatte *Periplaneta americana* soit au niveau synaptique c'est-à-dire sur la transmission synaptique entre les neurones sensoriels et les interneurones géants soit au niveau extra-synaptiques sur des corps cellulaires des cellules neurosecrétrices . La première partie de cette étude réalisée sur la transmission synaptique de type cholinergique a permis la mise en évidence de l'activité anti-AChE du DEET. Ces résultats ont été confirmés par une étude de cinétique enzymatique d'AChE de drosophile en présence de DEET, qui s'est révélé être un inhibiteur compétitif réversible de l'AChE (§ 4.1). Une étude complémentaire a permis de révéler que cet effet n'était pas le seul impliqué dans la neurotoxicité du DEET mais qu'une modification de l'homéostasie calcique des cellules neurosecrétrices pouvait être aussi impliquée

Matériel et méthodes

Le modèle biologique

L'étude des effets du DEET nécessite un modèle cellulaire très bien identifié et caractérisé du point de vue électrophysiologique. Les « Dorsal Unpaired Median » (DUM) neurones constituent un modèle de choix pour l'étude du mode d'action de composés à effet insecticide (Buckingham *et al* 1997 ; Weill *et al* 2000 ; Courjaret & Lapiède 2001; Dugravot *et al* 2003 ; Voets *et al* 2004 ; Price & Berry 2006; Gautier *et al* 2007).

Le système nerveux central (SNC) de la blatte *Periplaneta americana*, de l'ordre des blattoptères (*Blattaria*)¹ est constitué d'une chaîne nerveuse ventrale ganglionnaire (figure 1 A et B). Les ganglions sont divisés en quatre types selon leur localisation anatomique : les ganglions cérébroïdes ou « cerveau », les ganglions sous-œsophagiens, thoraciques et abdominaux (A1 à A6 ou Dernier Ganglion Abdominal, DGA) (figure 1 A). Au sein de chaque ganglion de la chaîne nerveuse ventrale (sauf ganglions cérébroïdes), est présente une petite population de neurones identifiés : les DUM neurones (Grolleau & Lapiède 2000a; Braunig & Pfluger 2001; Wicher 2001). La morphologie des DUM neurones a été décrite chez le criquet pour la première fois par (Plotnikova 1969). La dénomination de neurones dorsaux, impairs et médian a été utilisée à partir de l'étude réalisée par (Verschoyle *et al* 1992). Ils sont en plus

¹ La nouvelle classification, basée sur la phylogénie distingue dans l'ancien ordre des dictyoptères deux nouveaux ordres, celui des Blattoptères et celui des Mantoptères. (Source : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, http://locust.cirad.fr/tout_savoir/taxonomie/taxons_7.htm).

grande quantité dans le dernier ganglion abdominal (DGA) car celui-ci correspond à la fusion de cinq ganglions abdominaux primitifs (A7 à A11), révélés par la présence de plusieurs îlots de DUM neurones (Sinakevitch *et al* 1995) (figure 1 C et D). Les DUM neurones proviennent des neuroblastes impairs et médians (Median Neuroblast, MNB) qui sont localisés dans les primordia de chaque ganglion à l'exception des ganglions cérébroïdes (Stevenson & Sporhase-Eichmann 1995; Braunig & Pfluger 2001).

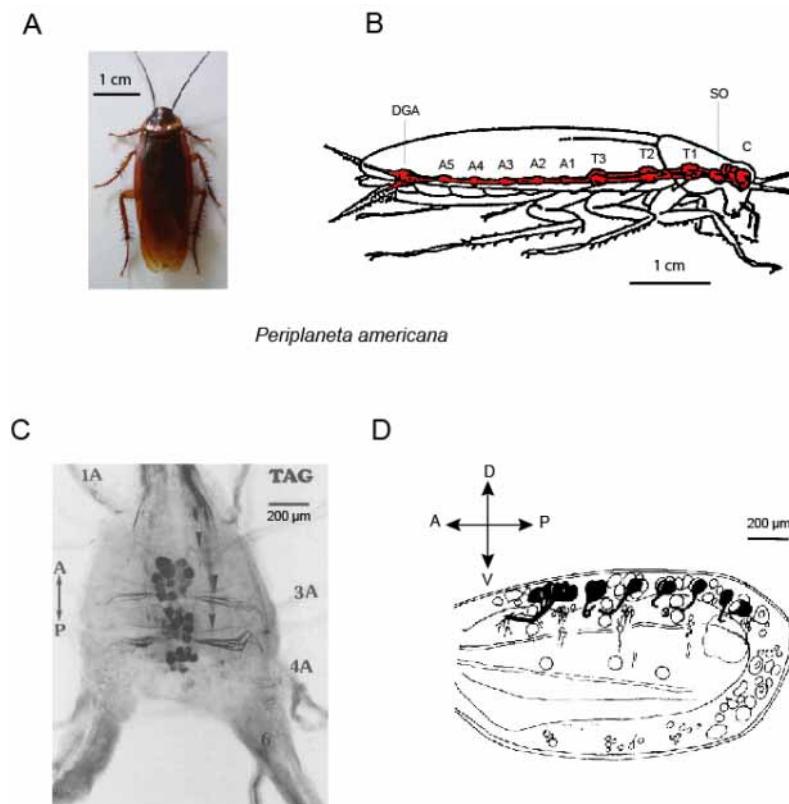


Figure 1 :

A : Photographie de blatte mâle adulte *Periplaneta americana*.

B : Représentation schématique du système nerveux central (en rouge) de la blatte *Periplaneta americana*. C : ganglions cérébroïdes ; SO : ganglions sous-oesophagiens ; T1 à T3 : ganglions thoraciques (pro, méso et métathoracique) ; A1 à A5 : ganglions abdominaux ; DGA : dernier ganglion abdominal.

C : Photographie montrant la localisation dorso-médiane des corps cellulaires des DUM neurones *in situ* du DGA de blatte mâle révélée à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine (Sinakevitch *et al* 1996). Les flèches indiquent les neurites des DUM neurones qui se projettent dans les nerfs 1A, 3A, 4A et 6. A : antérieur, P : postérieur.

D : Dessin d'une coupe sagittale du dernier ganglion abdominal de la blatte *Periplaneta americana*, précisant la localisation des DUM neurones (en noir) identifiés à l'aide d'anticorps polyclonaux anti-octopamine (modifié d'après Sinakevitch et coll., 1996).

Trois critères permettent de caractériser les DUM neurones :

Critères morphologiques :

Les DUM neurones se caractérisent par un corps cellulaire piriforme (diamètre entre 30 et 60 μm) d'où émerge un neurite primaire (Bräunig et Pflüger, 2001) (figure 2 A et B). Il existe trois grands types de

DUM neurones en fonction de la propagation des neurites latéraux (voir pour revue (Braunig & Pfluger 2001).

Les DUM neurones efférents présentent une arborisation neuritique en « T ». Leurs neurites secondaires quittent les ganglions par les nerfs périphériques spécifiques (figure 2 A). Les DUM neurones intersegmentaires ont une arborisation neuritique en « H » qui relie les ganglions entre eux via les connectifs. Les DUM interneurones locaux possèdent une arborisation neuritique qui se propage uniquement à l'intérieur de la masse intraneuropilaire du ganglion.

Critères biochimiques :

Ce sont des cellules neurosécrétrices qui synthétisent et libèrent, en particulier, de l'octopamine, une amine biogène caractérisée chez les invertébrés, et analogue de la dopamine chez les vertébrés (Roeder 2005) (Figure 1 C, D et 2 B). L'octopamine est connue pour être un neurotransmetteur, une neurohormone et un neuromodulateur (Braunig & Pfluger 2001; Roeder 2005). Les DUM neurones synthétisent également d'autres molécules neuroactives, telles que le GABA, la taurine, les peptides de type FMRF-amides, par exemple (Braunig & Pfluger 2001).

Critères électrophysiologiques :

Les DUM neurones ont un potentiel de membrane compris entre -45 et -60 mV et génèrent spontanément des potentiels d'action de grande amplitude (environ 110 mV), à fréquence régulière. Cette activité, dite de type « pacemaker », est une propriété intrinsèque du corps cellulaire. Elle est générée par l'activation en boucle de canaux ioniques dépendants du potentiel et modulée par des canaux ioniques responsables de courants dit de repos (Grolleau & Lapiet 2000b Defaix, 2005 #286 ; Wicher *et al* 2001; Dugravot *et al* 2003; Wicher *et al* 2004; Defaix & Lapiet 2005; Lavialle-Defaix *et al* 2006) (figure 2 C et tableau 1).

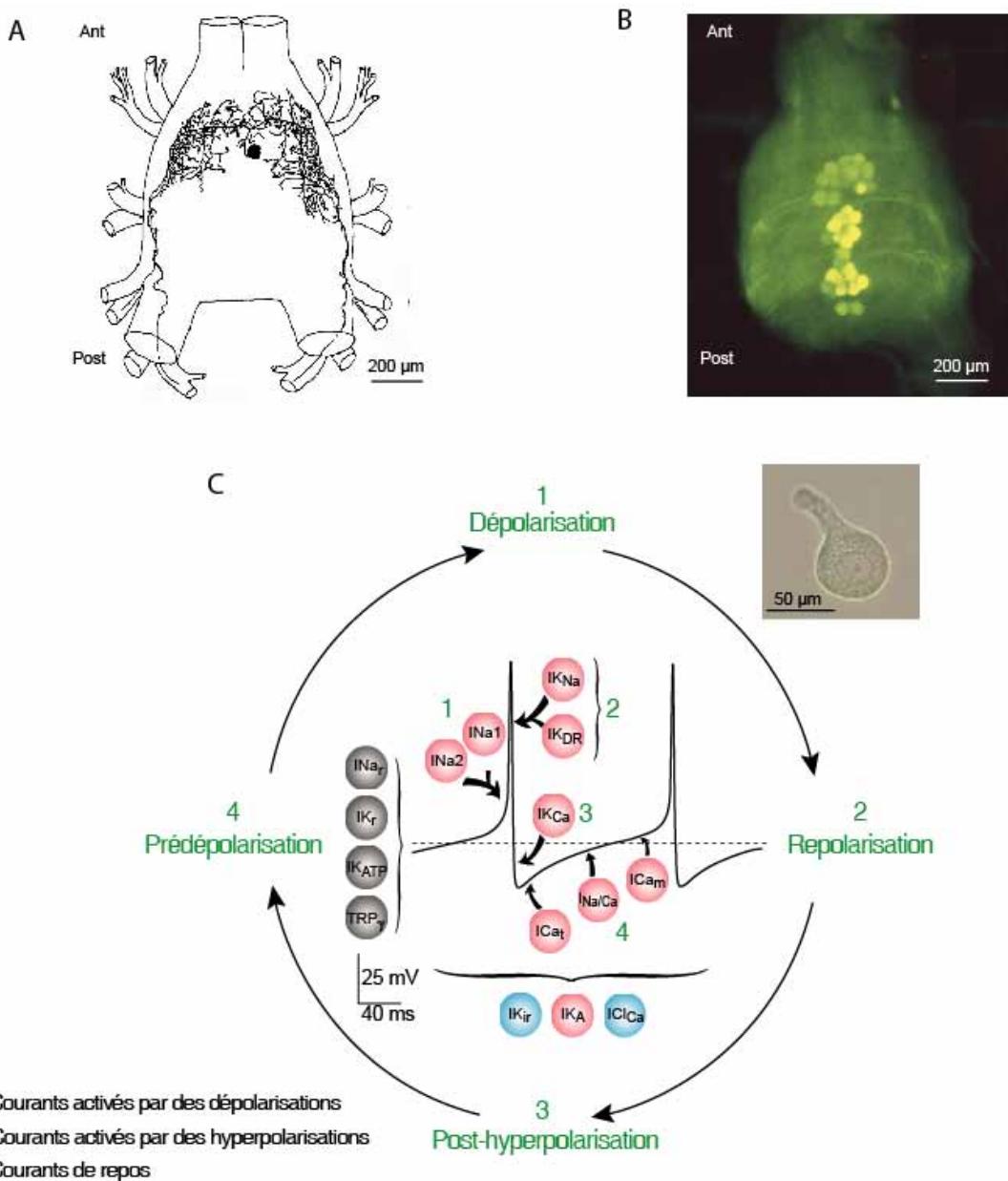


Figure 2 :

A : Morphologie d'un DUM neurone efférent de l'îlot antérieur du DGA de la blatte *Periplaneta americana*. L'arborisation neuritique ainsi que le corps cellulaire sont révélés par un marquage antérograde au chlorure de cobalt (modifié d'après Sinakevitch et coll. 1996). agrandissement : photographie d'un corps cellulaire de DUM neurone isolé du DGA de *P. americana* 24h après dissociation

B : Marquage par des anticorps polyclonaux anti-octopamine des DUM neurones in situ du DGA (d'après Grolleau et Lapiède, 2000).

C : Courants ioniques impliqués dans l'activité électrique spontanée des DUM neurones du DGA de *P. americana* (modifié d'après (Grolleau & Lapiède 2000a; Dugavot *et al* 2003; Wicher *et al* 2004; Defaix & Lapiède 2005; Lavialle-Defaix *et al* 2006; Wicher *et al* 2006a).

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

Technique de culture à court terme des DUM neurones

Matériel biologique

Les DUM neurones sont isolés du DGA de la chaîne nerveuse ventrale de la blatte mâle adulte *Periplaneta americana*. Les blattes sont élevées au laboratoire à une température constante de 29°C, avec une photopériode alternant 12h de lumière artificielle et 12h d'obscurité. Seuls les adultes mâles sont prélevés pour différentes raisons : le système nerveux central des blattes mâles est moins recouvert de tissus adipeux que les femelles ce qui facilite la dissection. De plus, la grande majorité des connaissances anatomiques et fonctionnelles proviennent d'expérimentations effectuées sur les blattes mâles adultes (Hue & Callec 1990)..

Prélèvement des derniers ganglions abdominaux

Après avoir sectionné la tête, les pattes et les ailes, la blatte est épinglée face dorsale sur un support en polystyrène recouvert de papier aluminium désinfecté à l'alcool. Le système nerveux des insectes se situant sur la face ventrale, la dissection est donc effectuée par ce côté pour limiter la contamination des ganglions résultant du prélèvement du tube digestif. Sous contrôle binoculaire (grossissement x6.4 puis x16), une fenêtre est réalisée dans la cuticule ventrale au niveau du DGA. Les viscères sont aussitôt recouverts de LP1 (tableau 2) additionné d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine, Sigma, L'isle d'Abeau Chesnes, France) afin d'éviter tout dessèchement de la préparation. Après avoir retiré la glande conglobée puis écarté les glandes accessoires, il est possible de prélever le DGA en sectionnant les nerfs céraux et le connectif qui relie le cinquième ganglion au DGA. Le ganglion ainsi prélevé est alors déposé dans une boîte de culture contenant du LP1 (figure 3 et tableau 2). Un nettoyage plus minutieux du ganglion est effectué à l'aide d'aiguilles montées pour éliminer les ramifications nerveuses et les trachées résiduelles. A chaque dissociation, six ganglions sont prélevés de cette façon.

Digestion enzymatique

Les six ganglions sont ensuite placés dans un tube à hémolyse stérile contenant de la collagénase type IA (300 UI/mL, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA) (LP2, tableau 2). La digestion enzymatique est effectuée dans une étuve maintenue à une température de 29°C en atmosphère humide pendant 35 minutes. Les ganglions sont ensuite rincés dans deux bains successifs de LP1 (5 minutes chacun) (figure 3).

Dissociation mécanique

Les ganglions sont transférés dans un tube à hémolyse contenant du LP3 (tableau 2) enrichi en sérum de veau fœtal (GibcoBRL, Paisley, Ecosse). La dissociation mécanique s'effectue par aspirations-refoulements successifs à l'aide de pipettes Pasteur dont les diamètres sont progressivement réduits à la flamme (figure 3). Le premier diamètre a pour but de désorganiser la structure du ganglion, le deuxième, d'isoler les îlots de DUM neurones et le troisième d'individualiser les corps cellulaires. Pour les expériences de patch-clamp, les cellules ainsi isolées sont déposées dans des boîtes de Pétri (35 mm, Falcon, AES France) préalablement traitées à la poly-D-lysine (100 µg/ml, MM 70000-150000, Sigma chimie) (figure 3). La poly-D-lysine permet l'adhérence des neurones sur le fond de la boîte. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées 24h dans l'étuve à 29°C en atmosphère humide, avant de procéder aux différentes expériences.

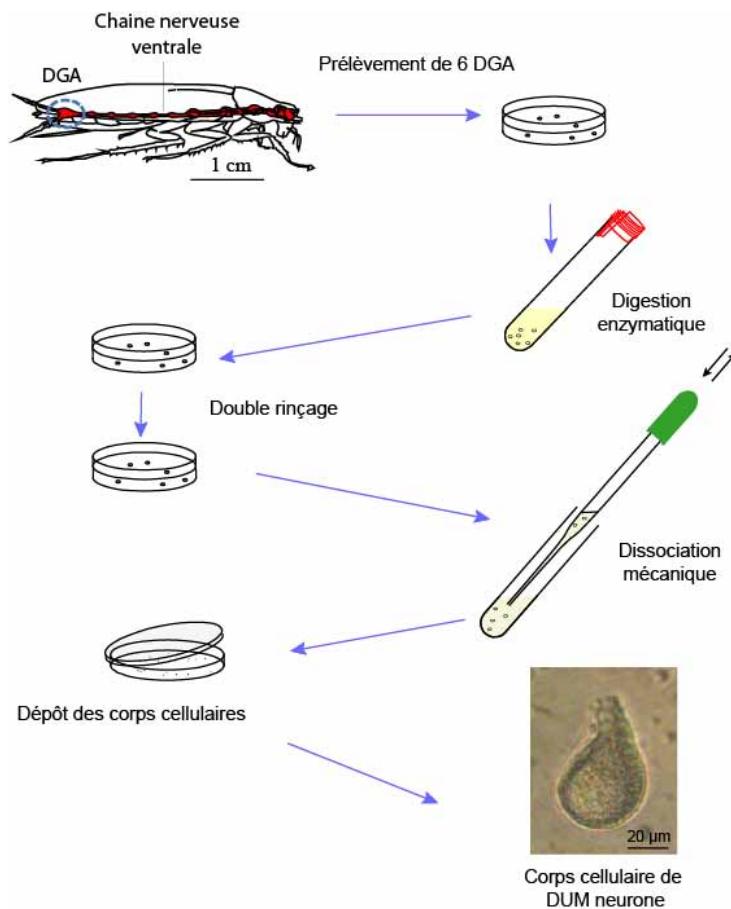


Figure 4.3 : Principales étapes de la technique de dissociation cellulaire pour obtenir les corps cellulaires isolés de DUM neurones.

Technique électrophysiologique du patch-clamp

Principe et dispositif expérimental

La technique du patch-clamp permet d'étudier le comportement des canaux ioniques d'une cellule en isolant électriquement une portion de sa membrane. Cet isolement est réalisé en appuyant une pipette de verre (diamètre la pointe de l'ordre de 1 µm) sur la membrane de la cellule. L'application d'une légère pression négative à l'intérieur de la pipette permet d'obtenir une zone de forte résistance électrique entre la pipette et la membrane qui dépasse le gigaohm. C'est la configuration « cellule attachée » (Figure 4 A).

Au cours de ce travail, la configuration utilisée est dite « cellule entière » (Figure 4 A). Elle est obtenue en appliquant une pression négative supplémentaire à l'intérieur de la pipette qui provoque la rupture de la membrane sous la pointe de la pipette. Le contenu du cytoplasme étant dialysé par le milieu intrapipette, il est possible de contrôler et de modifier la composition du milieu intracellulaire.

La configuration « cellule entière » permet deux types de mesures :

- En réponse à des échelons de courants dépolarisants ou hyperpolarisants, elle permet d'enregistrer des variations de potentiel ou des potentiels d'action. Ce sont les **conditions de courant imposé**.
- En imposant un potentiel de membrane contrôlé en amplitude et en durée, il est possible de mesurer des variations de courants ioniques résultant de l'ouverture de tous les canaux ioniques.. C'est la **condition de potentiel imposé**.

Le dispositif expérimental de la technique électrophysiologique de patch-clamp est représenté figure 4 C . Les boîtes de pétri contenant les corps cellulaires des DUM neurones sont placées sur la platine d'un microscope inversé (CK2, Olympus, Rungis, France) posé sur une table anti-vibration et intégré dans une cage de Faraday. La pipette de patch-clamp est reliée à la tête de l'amplificateur (Axopatch 200A, Axon Instruments, FosterCity, USA). Ces deux derniers éléments sont solidaires d'un micromanipulateur piézo-électrique (Burleigh TS-5000-150, Burleigh Instruments, New York, USA). La partie fixe de l'amplificateur est connectée à un oscilloscope numérique Nicolet 3091 (Nicolet Instruments, Madison, USA) pour la visualisation du signal. Un stimulateur programmable SMP300 (Biologic, Claix, France) permet d'appliquer des chocs électriques aux cellules. L'enregistrement des signaux est effectué sur le disque dur d'un ordinateur (Pentium II 33A, Nec computers, Angers, France) *via* une interface (Labmaster, TL-1-125, Axon Instruments) ou sur cassettes numériques DAT (Digital Audio Tape) (DTR 1204, Biologic).

Les pipettes de patch-clamp sont étirées à partir de micro-capillaires en verre borosilicaté (GC 150T-10, Harvard Apparatus, Edenbridge, GB) avec une étireuse verticale (PP83, Narishige, Tokyo, Japon). La résistance des pipettes de patch varie entre 0,8 et 2 MΩ en fonction des conditions expérimentales.

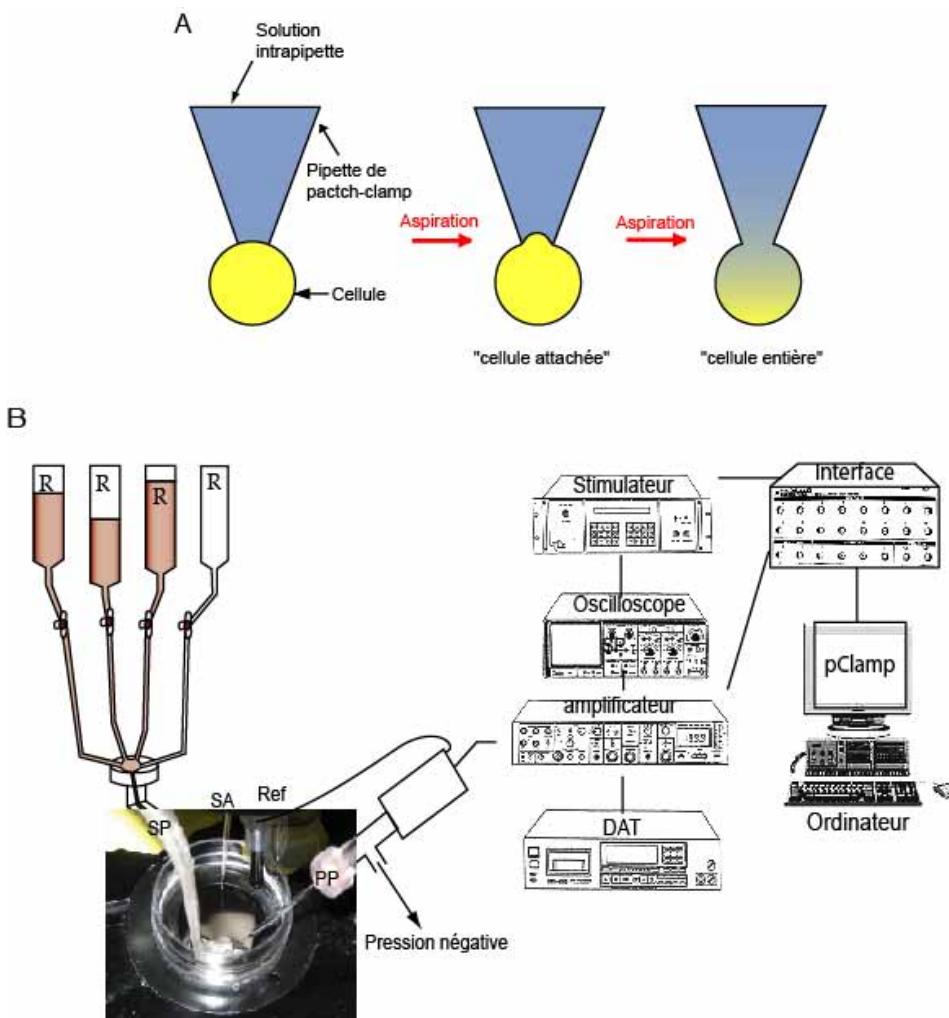


Figure 4

A : Représentation schématique des configurations « cellule attachée » et « cellule entière ».

B : Représentation schématique de l'installation de patch-clamp. A gauche, les quatre réservoirs (R) sont connectés par un seul cathéter placé sur le système de superfusion (SP). Un système d'aspiration (SA) maintient un niveau constant de liquide dans la boîte de culture. La pipette de patch-clamp est fixée sur le porte-pipette (PP). L'amplificateur mesure les différences de potentiel entre la pipette et l'électrode de référence (Ref). L'amplificateur est relié d'une part, à l'oscilloscope pour visualiser les variations de courants et de potentiels ainsi chocs appliqués par le stimulateur, et d'autre part au système d'acquisition pClamp via l'interface ou à l'enregistreur DAT (Digital Audio Tape).

Composition et application des solutions

Les solutions extracellulaires et intrapipettes utilisées ont été définies de façon à pouvoir étudier soit l'activité électrique spontanée, soit le courant sodium (Lavialle-Defaix *et al* 2006). Les solutions sont appliquées au moyen d'un système de perfusion gravimétrique multicanaux. Ce système présente l'avantage de pouvoir changer rapidement la composition du milieu extracellulaire afin de tester les différentes solutions ou divers agents pharmacologiques. Ce système gravimétrique est fixé et dirigé par un micromanipulateur (Narishige, Japon) qui permet de positionner la perfusion à environ 100 µm du corps

cellulaire. Un système d'aspiration assure le renouvellement régulier du milieu et maintient un volume constant dans la boîte de culture (Figure 4 C).

Technique d'imagerie calcique sur DUM neurones isolés

Principe de la technique

La mesure de la concentration en calcium intracellulaire n'est possible qu'en utilisant des indicateurs qui se lient au calcium. De nombreux indicateurs sont disponibles et sont répartis en trois groupes : 1) les photoprotéines telles que les aequorines qui sont des indicateurs luminescents, c'est-à-dire qu'elles émettent de la lumière lorsqu'elles sont liées au calcium. 2) les indicateurs dont la fluorescence d'excitation ou d'émission est modifiée lors de la liaison au calcium. 3) les protéines sensibles au calcium qui sont basées sur l'association entre une protéine fluorescente et la calmoduline (Brownlee 2000).

Ils existent plus d'une centaine d'indicateurs fluorescents qui sont très largement utilisés. Leur structure présente une forte homologie avec un chélateur du calcium tel le BAPTA et l'EGTA associé à un fluorophore (Brownlee 2000). De nombreux types cellulaires peuvent être chargés par une simple incubation avec la forme acétoxyméthylester (AM) des sondes fluorescentes. Sous cette forme, liposoluble, les molécules pénètrent dans la cellule où elles seront clivées par des estérases intracellulaires en une forme hydrosoluble et imperméable séquestrée dans le cytoplasme (Figure 5 A).

L'indicateur utilisé pour les mesures de calcium intracellulaire sur les DUM neurones, le fura-2, permet de réaliser des mesures ratiométriques. Cette sonde est dite « double-excitation/simple-émission ». Lorsque la sonde est libre elle présente un maximum d'émission pour une longueur d'onde d'excitation de 380 nm et lorsqu'elle est liée au calcium son maximum d'émission est pour une longueur d'onde de 340 nm. Dans les deux cas, la fluorescence émise est enregistrée à une longueur d'onde de 510 nm. Un rapport (R) est calculé entre les fluorescences émises à 340 nm et 380 nm.

Dans le but de déterminer la concentration réelle en calcium correspondant à R, une calibration est nécessaire. Une solution dépourvue de calcium contenant 10 mM d'EGTA (chélateur du calcium) permet de mesurer R lorsque toute la sonde est libre (R_{\min}) et une solution riche en calcium (10 mM) avec 0,1% de triton X 100 (perméabilisant de membrane) permet la mesure de R_{\max} (R lorsque toute la sonde est liée).

La concentration en calcium intracellulaire est alors déterminée à partir de l'équation suivante (Grynkiewicz, 1985) :

$$[Ca^{2+}]_i = Kd \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right) x \beta$$

K_d est la constante de dissociation de la sonde pour le calcium (225 nM pour le fura 2), R_{min} est la valeur de R lorsque la sonde est totalement libre et R_{max} lorsqu'elle est totalement liée au calcium, β est le rapport entre la fluorescence mesurée à 380 nm pour la sonde libre et à 340 nm pour la sonde liée au calcium. L'évolution du rapport des fluorescences permet de quantifier directement les variations de la concentration en calcium intracellulaire.

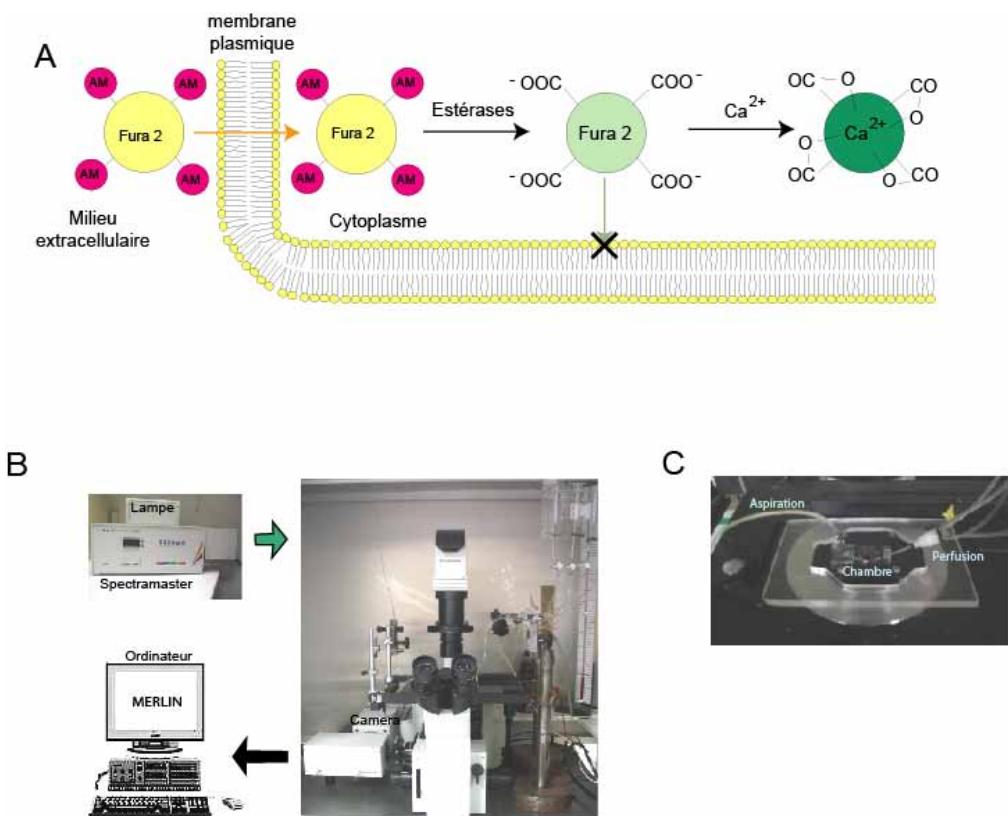


Figure 5

A : Principe de l'utilisation d'une sonde acétoxyméthylée, exemple du fura 2. Lorsque la molécule de fura 2 est acétoxyméthylée (AM) elle est liposoluble donc elle traverse les membranes. Les estérases cellulaires vont cliver les résidus acétoxyméthyle ce qui rend le fura 2 hydrosoluble et le piége ainsi dans le cytoplasme. C'est sous cette forme que le fura 2 est à même de lier un ion calcium.

B : Dispositif expérimental pour l'enregistrement de la concentration en calcium intracellulaire.

C : Photographie de la chambre de perfusion positionnée sur la platine du microscope.

Dispositif expérimental

Le protocole de dissociation cellulaire est le même que celui présenté précédemment pour les expériences de patch-clamp. Les DUM neurones sont cependant déposés sur des lames de verre recouvertes de poly-D-lysine afin de limiter les interférences entre le support et le faisceau lumineux.

Les cellules sont incubées dans du LP4 (tableau 2) contenant 10 µM de Fura 2-AM et 0,5% d'acide pluronique pendant 90 min à 35°C, à l'obscurité, pour permettre la pénétration de la sonde dans

les cellules. Les lames sont ensuite rincées trois fois dans du LP4 puis remises à incuber pendant 60 min pour permettre un clivage optimal de la sonde dans le cytoplasme. Cette étape est très importante car le clivage libère les groupements carboxyliques dont les oxygènes électronégatifs vont permettre le piégeage des ions calcium (Figure 5 A). Les lames sont ensuite montées dans une chambre d'enregistrement (Warner Instruments, Hamden, USA) (Figure 5 C). Celle-ci est déposée sur la platine d'un microscope inversé (Olympus, IX50) et reliée à un système de perfusion gravimétrique (figure 5 B). Les longueurs d'ondes d'excitation sont produites par une lampe à xénon (Life Sciences Resources Ltd, cambridge, GB) et sont sélectionnées par un monochromateur de type spectramaster (Life Sciences Resources) commandé par ordinateur. La fluorescence émise est captée par une camera CCD (Olympix FE250, Olympus). Le logiciel Merlin (version 2.0, Life Sciences Resources) permet de sélectionner les longueurs d'ondes, le temps d'exposition (150 ms), d'enregistrer les images et de mesurer en temps réel et de façon spatio-temporelle (le ratio est calculé toutes les 13,1 secondes) l'évolution de la concentration en calcium intracellulaire (figure 5 B).

Résultats

Action du DEET sur l'activité électrique des DUM neurones

Les premiers résultats concernant l'effet du DEET sur le SNC des insectes ont été observés sur l'activité électrique des DUM neurones de la blatte *Periplaneta americana*. L'application d'une solution physiologique contenant 100 µM de DEET entraîne une diminution de l'amplitude du potentiel d'action (à partir de 5 minutes) qui s'accentue jusqu'à la disparition de l'activité électrique du DUM neurone (au bout de 15 minutes d'expérimentation) (Figure 6 A). Ces premiers résultats indiquent clairement des effets neurotoxiques du DEET, qu'il est important de dissocier en utilisant une concentration plus faible.

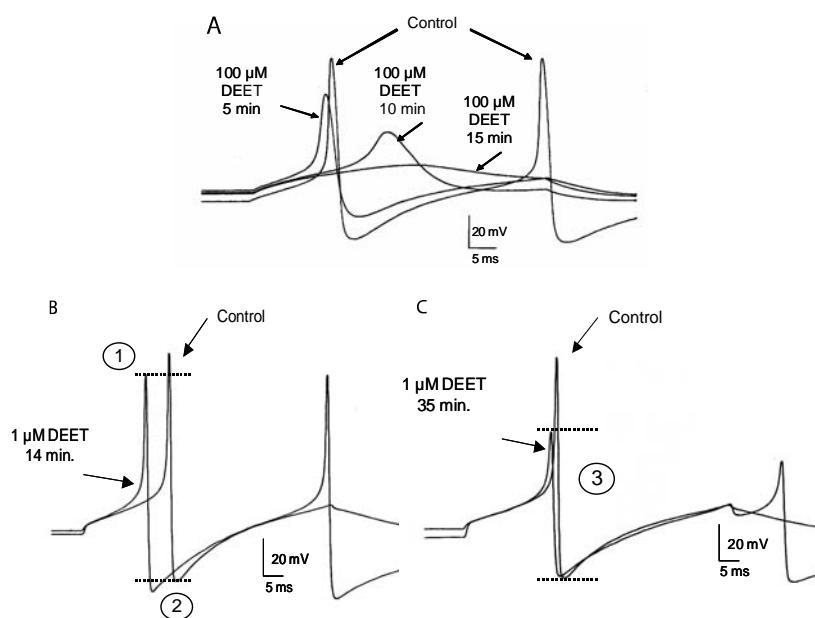


Figure 6 :

Effet du DEET sur les potentiels d'action déclenchés de corps cellulaire de DUM neurone enregistrés par la technique du patch-clamp en condition de courant imposé (intensité du choc 0,8 nA, durée 50 ms) à partir d'un potentiel de membrane d'environ -45 mV

A. Effet du DEET à 100 µM sur les PA de DUM neurone. Diminution de l'amplitude du PA à 5, 10 et 15 min d'application.

B. Effet du DEET à 1 µM sur les PA de DUM neurone, 14 min après l'application.

1 : Diminution de l'amplitude de la phase de dépolarisation du PA.

2 : Augmentation de la phase de post hyperpolarisation.

C. Effet du DEET à 1 µM sur les PA de DUM neurone, 35 min après application.

3 : Diminution de l'amplitude du PA

Dans les mêmes conditions expérimentales, une dose 100 fois faible de DEET (1 µM) a été testée sur l'activité électrique des DUM neurones. A cette concentration, le DEET induit au bout de 14 min d'application, une diminution de la phase de dépolarisation du potentiel d'action (PA) associée à une potentialisation de la phase de post-hyperpolarisation. Ces effets pourraient suggérer une action du DEET 1) sur les courants sodium dépendants du potentiel, connus pour être impliqués dans la genèse de l'activité électrique (Lapiède *et al* 1990a) (figure 4.6 B) et 2) sur les courants potassium dépendants du calcium, responsables du développement de la phase de post-hyperpolarisation (Grolleau & Lapiède 1995). Après 30 min d'application, le DEET provoque une diminution beaucoup plus importante de l'amplitude du potentiel d'action (figure 6 C).

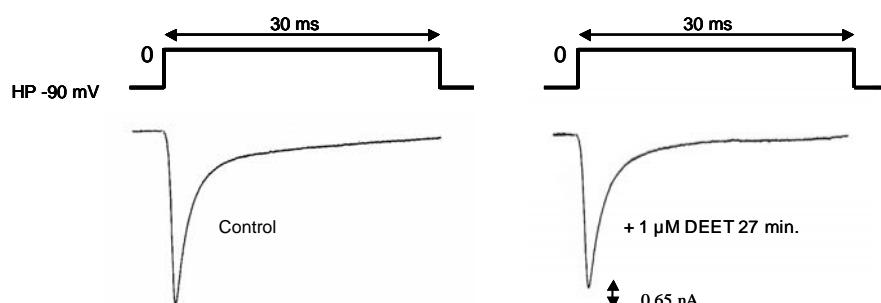


Figure 7 : Effet du DEET à 1 µM sur le courant sodium d'un corps cellulaire de DUM neurone. Conditions de potentiel imposé Illustration des courants sodium enregistrés en réponse à une impulsion dépolarisante à 0 mV pendant 30 ms à partir d'un potentiel de référence (HP) de -90 mV. HP : Holding Potential

Afin de déterminer si les courants sodium sont directement impliqués dans l'effet du DEET, une série d'expériences ont été réalisées dans des conditions de potentiel imposé, en présence de bloqueurs des différents courants ioniques membranaires (e.g., potassium et calcium) (Grolleau & Lapiède 2000b). La figure 7 montre que l'application de 1µM de DEET ne modifie pas l'amplitude du courant sodium de façon significative. Ce résultat préliminaire laisse supposer une action indirecte du DEET sur la phase de dépolarisation.

Comme indiqué ci-dessus, ce sont les courants potassium dépendants de la concentration en calcium intracellulaire qui sont impliqués dans la phase de post-hyperpolarisation (Grolleau & Lapiède 1995). A

partir de ces résultats, l'effet indirect du DEET sur ces courants ioniques, via une variation de la concentration en calcium intracellulaire, a été investigué. .

Action du DEET sur la concentration de calcium intracellulaire des DUM neurones

La technique ratiométrique d'imagerie calcique permet de suivre les variations de calcium intracellulaire au cours de l'application extracellulaire de DEET. La figure 8 A,B indique que le DEET ($10 \mu\text{M}$) provoque une augmentation dose-dépendante de la concentration en calcium intracellulaire $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

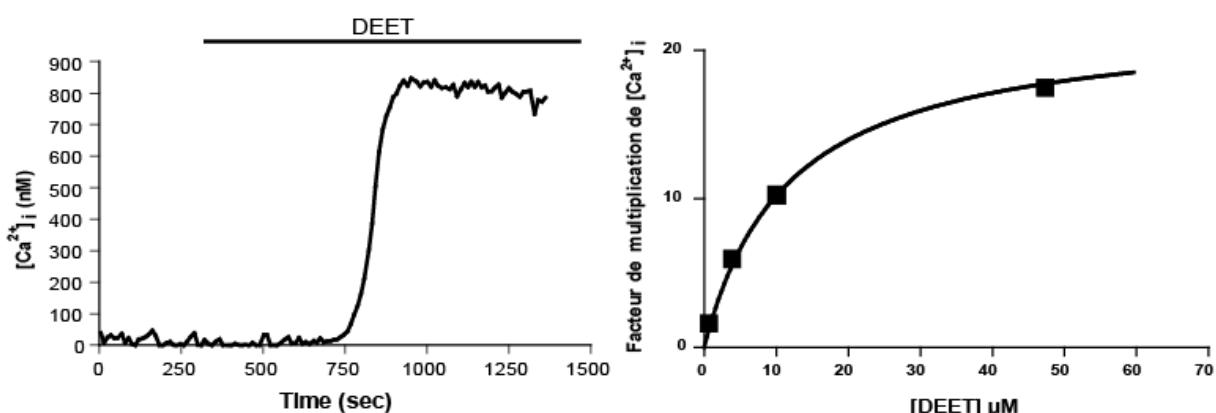


Figure 8 :

- A. Evolution de la concentration en calcium intracellulaire après application externe de $10 \mu\text{M}$ de DEET sur un corps cellulaire de DUM neurone
- B. Représentation du facteur de multiplication de l'élévation de calcium intracellulaire de corps cellulaires de DUM neurones en fonction de la concentration de DEET.

L'objectif suivant a été de déterminer l'origine de la variation de calcium intracellulaire. Pour cela, une solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium (i.e., contenant de l'EGTA) a été appliquée sur le corps cellulaire du DUM neurone pendant l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par $10 \mu\text{M}$ de DEET. Dans ces conditions, l'application de cette solution provoque une réduction de l'effet du DEET. Néanmoins, deux cinétiques différentes décrivent la diminution de calcium intracellulaire observée. Selon les cellules testées, il est observé soit une diminution mono-exponentielle, permettant un retour de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ au niveau de base (figure 9 A,C), soit une diminution bi-exponentielle qui décrit une réduction de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en deux phases, l'une rapide suivie par une phase de diminution plus lente qui se stabilise pour atteindre un plateau dont la valeur de calcium intracellulaire est supérieure à la concentration en calcium de base. (figure 9 B, C). Dans ce dernier cas, le plateau suggère une autre source de calcium impliquée dans l'effet du DEET. A partir de ces résultats, il a été observé que le décours mono ou bi-exponentiel de la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par la superfusion de solution extracellulaire dépourvue d'ions calcium, dépend de la concentration en calcium de base du DUM neurone étudié (figure 9 D). Ces observations suggèrent l'existence d'un seuil de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ au delà duquel une seconde composante peut être déclenchée. En d'autres termes, pour une concentration en calcium de base relativement faible (15 nM), l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induite par le DEET ne ferait intervenir que le calcium extracellulaire (donc une seule composante). Pour des concentrations en calcium de base légèrement plus élevées (20 nM), le seuil de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est atteint, ce qui

permet d'activer une composante supplémentaire (i.e., décours bi-exponentiel) observée en présence de DEET. L'existence d'un tel mécanisme, déjà décrit sur les DUM neurones, pourrait correspondre au mécanisme de libération auto-catalytique de calcium (i.e., CICR pour « Calcium Induced Calcium Release ») (Messutat *et al* 2001).

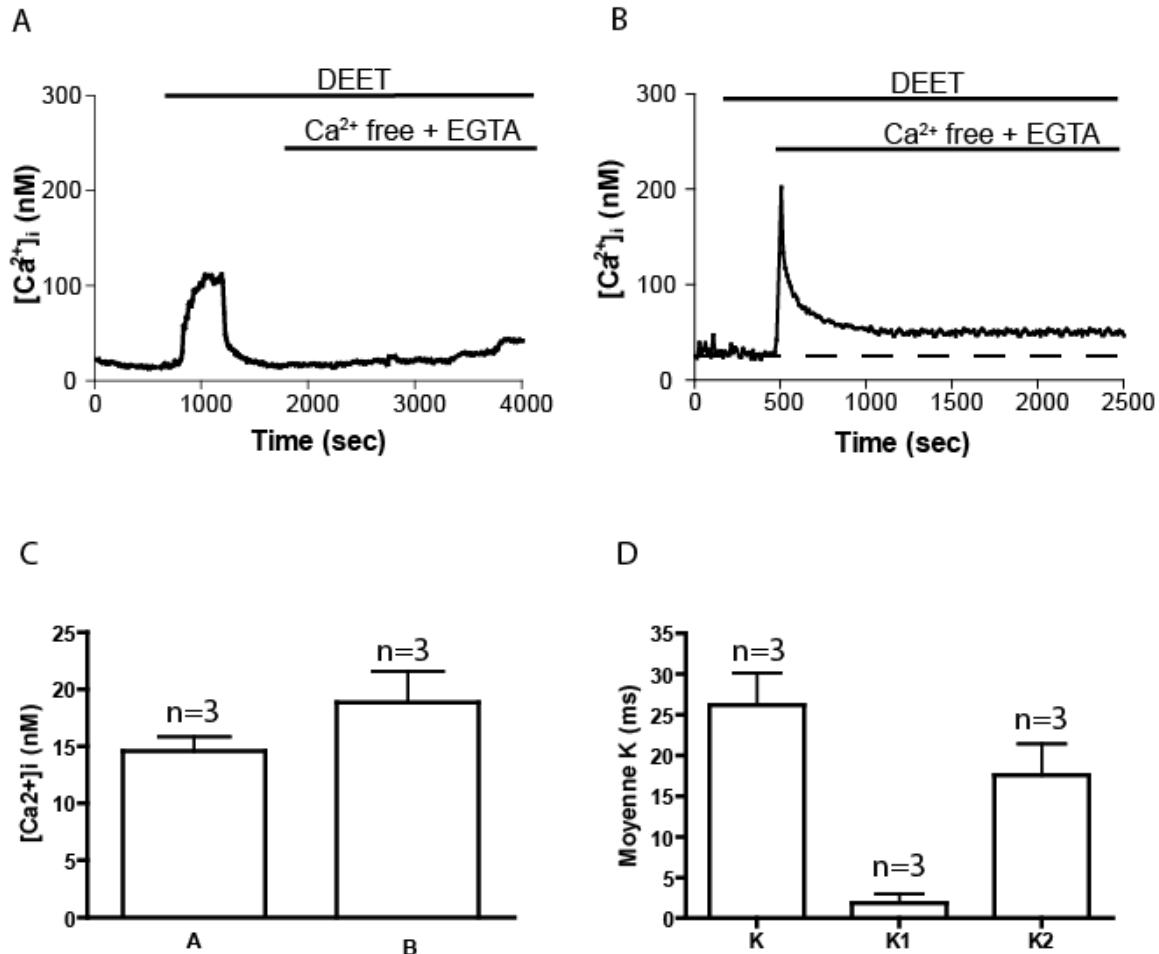


Figure 9 :

A.B. Exemples représentatifs de l'évolution de la concentration en calcium intracellulaire en présence de DEET 10 μM puis d'une solution dépourvue de calcium additionnée à de l'EGTA. Le changement de solution extracellulaire a été effectué lors de l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Notons que les cellules de type A présentent une décroissance mono exponentielle et que les cellules de type B présentent une décroissance bi-exponentielle.

C. Histogramme représentant les moyennes de la concentration de base en calcium intracellulaire des cellules testées. A : Cellules dont la diminution de [Ca²⁺]_i a présenté une cinétique mono-exponentielle. B : Cellules dont la diminution en [Ca²⁺]_i a présenté une cinétique bi-exponentielle.

D. Histogramme représentant les moyennes des constantes de temps observées pendant la décroissance en [Ca²⁺]_i après application d'une solution dépourvue de calcium en présence d'EGTA.

De plus, les expériences montrent une augmentation spatio-temporelle hétérogène de la [Ca²⁺]_i dans le corps cellulaire (figure 10 A,B). L'élévation de la [Ca²⁺]_i, observée dans un premier temps au niveau du pôle apical du corps cellulaire, s'effectue avec une cinétique plus rapide que dans le reste de la cellule (pôle basal) où l'augmentation de la [Ca²⁺]_i apparaît plus tardivement (figure 4.10 A,B). Ces résultats renforcent l'hypothèse concernant la participation des stocks de calcium intracellulaire dans l'effet du DEET sur des DUM neurones dont la concentration en calcium de base est plus élevée.

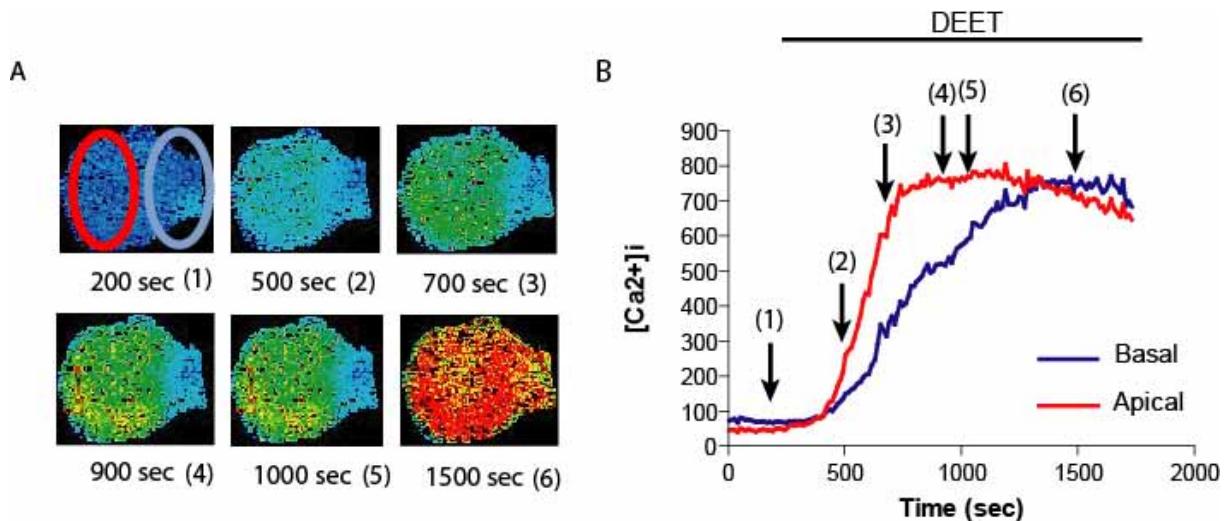


Figure 10 :

A. Représentation en fausses couleurs (Merlin software) de l'évolution spatio-temporelle de la concentration en calcium intracellulaire en fonction du temps dans le corps cellulaire de DUM neurones.

B. Spectres représentant les variations de la concentration en calcium intracellulaire dans les zones basale (bleu) et apicale (rouge) en fonction du temps après une application de DEET 10 μM (382 sec).

Pour confirmer l'implication du CICR, des expériences supplémentaires ont été réalisées en présence de ryanodine connue pour inhiber à forte concentration, les récepteurs sensibles à la ryanodine. En effet, il a été montré dans la littérature que la ryanodine pouvait induire un double effet sur les stocks de calcium intracellulaire en fonction de la concentration utilisée. À faible concentration, ce composé se comporte comme un agoniste des récepteurs Ryanodine (RyR). Dans ce cas, l'effet se traduit par une augmentation de la [Ca²⁺]_i. Pour des concentrations plus élevées, l'effet observé sur les RyRs est antagoniste, inhibant ainsi la libération de calcium des stocks intracellulaires (Messutat *et al* 2001). Dans notre cas, une concentration de 100 μM de ryanodine a été testée sur DUM neurones. Comme illustré dans la figure 11, la ryanodine produit une augmentation de la [Ca²⁺]_i dans les premières minutes d'application. L'effet se stabilise pour atteindre un plateau, suggérant un effet agoniste de ce composé. Dans ces conditions, la superfusion d'une solution contenant un mélange ryanodine / DEET (10 μM) ne produit qu'une faible variation de la [Ca²⁺]_i comparée à celle observée en présence de DEET seul (Fig 4.6 et Fig 4.11).

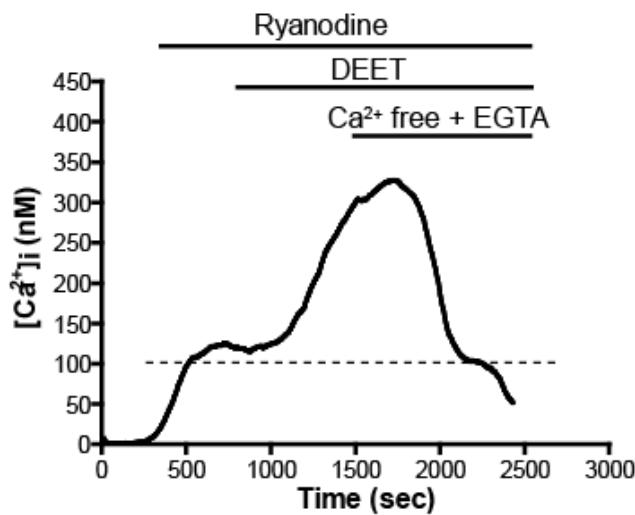


Figure 11 :

Variation de la concentration en calcium intracellulaire après un prétraitement à la ryanodine ou Rya (inhibiteur des récepteurs à Ryanodine, à forte concentration).

L'application de la Rya à 100 µM provoque dans un premier temps une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. Puis l'effet se stabilise, indiquant une effet antagoniste. L'application du mélange ryanodine / DEET provoque une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ plus faible que lorsque le DEET est appliquée seul. L'application d'une solution dépourvue de calcium dans le milieu ramène la $[Ca^{2+}]_i$ au niveau plateau de calcium atteint en présence de Rya (pointillés).

D'après la littérature, l'entrée du calcium dans les DUM neurones peut se faire par différents canaux calcium qui se caractérisent par leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques. On distingue les canaux calcium à haut seuil d'activation (HVA pour High Voltage-Activated), situés au niveau du segment initial (pôle basal) du corps cellulaire (Wicher & Penzlin 1997; Grolleau & Lapiède 2000b; Wicher 2001; Grolleau *et al* 2006), les canaux de type TRP-γ (Transient Receptor Potential γ), localisés au niveau du pôle apical (Wicher *et al* 2004; Wicher *et al* 2006b) et les canaux calcium à bas seuil d'activation (LVA pour Low Voltage-Activated) impliqués dans la genèse de la phase de pré-dépolarisation (Grolleau & Lapiède 1996, 2000b). Afin de déterminer le type de canaux ioniques responsables de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par le DEET, les DUM neurones ont été prétraités avec deux agents pharmacologiques spécifiques des ces canaux calcium : le chlorure de cadmium ($CdCl_2$) qui inhibe tous les canaux calcium (LVA et HVA et TRP), l' ω -conotoxine (ω -cgtx GVIA), spécifique des canaux calcium de type HVA (tableau 1 et figure 12).

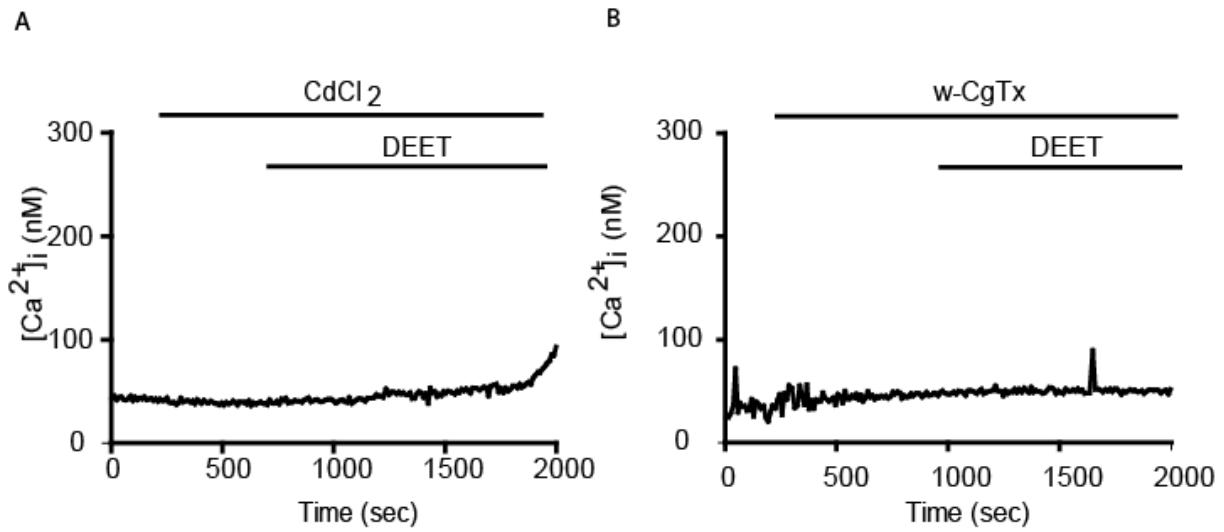


Figure 12. Effet du DEET 10 μ M sur la concentration en calcium intracellulaire en présence de différents agents pharmacologiques.

A. Variation de $[Ca^{2+}]_i$ après un prétraitement au chlorure de cadmium (CdCl₂) 500 μ M

B. Variation de $[Ca^{2+}]_i$ après un prétraitement à ω -conotoxine GVIA (ω -CgTx) 200 μ M

Le prétraitement des corps cellulaires des DUM neurones par le CdCl₂ (500 μ M) inhibe l'effet du DEET (figure 12 A). Cet effet confirme la participation du calcium extracellulaire dans la variation de la $[Ca^{2+}]_i$ décrite précédemment. De plus, des effets similaires ont été obtenus lors de l'application d' ω -CgTx GVIA (200 μ M), suggérant que l'activation des canaux calcium de type HVA, constitue la première étape dans l'effet du DEET sur la $[Ca^{2+}]_i$ (figure 12 B). Or, il a été montré que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ due à l'ouverture des canaux calciques HVA pouvait activer les TRP- γ (Grolleau *et al* 2006). Néanmoins, il sera nécessaire de confirmer cette hypothèse en prétraitant avec le LOE 908, qui inhibe les TRP- γ (Wicher *et al* 2006b). Les canaux calcium de type HVA sont dépendants du potentiel, une étude supplémentaire a été entreprise pour mettre en évidence le mécanisme cellulaire qui pourrait expliquer l'origine de la dépolarisation induite par le DEET nécessaire pour activer ces canaux ioniques et donc provoquer une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les DUM neurones (Grolleau *et al* 2006).

Il a été possible de montrer que le DEET produit également un effet toxique par l'inhibition de l'acétylcholinestérase, enzyme impliquée dans la dégradation de l'acétylcholine libérée au niveau synaptique (voir § 4.1). Partant de ces observations, l'hypothèse que le DEET puisse mimer l'effet du neurotransmetteur l'acétylcholine sur des récepteurs cholinergiques des DUM neurones et ainsi provoquer une dépolarisation membranaire, a été envisagée. A l'heure actuelle, trois types de récepteurs cholinergiques ont été caractérisés du point de vue pharmacologique sur les DUM neurones, 1) les récepteurs cholinergiques de type nicotiniques, résistant à l'alpha-bungarotoxine, 2) les récepteurs cholinergiques de type muscariniques et 3) les récepteurs mixtes sensibles à l'alpha-bungarotoxine, ayant des propriétés pharmacologiques nicotino-muscariniques (Lapied *et al* 1990b; Grolleau *et al* 1996).

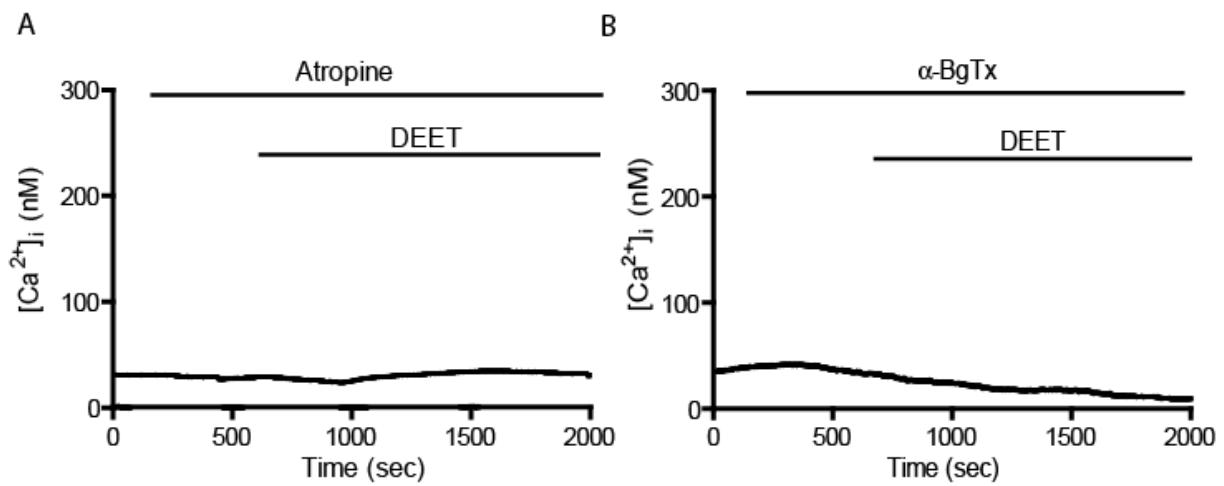


Figure 13 : Effet du DEET 10 μ M sur la concentration en calcium intracellulaire en présence de différents agents pharmacologiques.

A. Variation de $[Ca^{2+}]_i$ après un prétraitement à l'atropine 1 μ M

B. Variation de $[Ca^{2+}]_i$ après un prétraitement à l' α -bungarotoxine (α -Bgtx) 0,1 μ M

Afin de déterminer un possible effet du DEET sur les récepteurs cholinergiques des DUM neurones, des expériences préliminaires ont été réalisées en présence d'atropine (antagoniste des récepteurs muscariniques et mixtes) et d'alpha-bungarotoxine (inhibiteur spécifique des récepteurs mixtes dans le cas des DUM neurones). Comme illustré dans la figure 13 A,B, le prétraitement des corps cellulaires des DUM neurones par l'atropine (1 μ M) ou l'alpha-bungarotoxine (100 nM), inhibent l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ produite par le DEET (10 μ M). Bien que ces résultats soient préliminaires, il est important d'indiquer, et ceci pour la première fois, que le DEET peut exercer un effet neurotoxique via une dépolarisation membranaire, générée par l'activation de récepteurs cholinergiques identifiés aux récepteurs mixtes.

Conclusion et Perspectives

En conclusion, le schéma hypothétique de synthèse (figure 14) résume les différents événements mis en jeu dans l'effet neurotoxique du DEET.

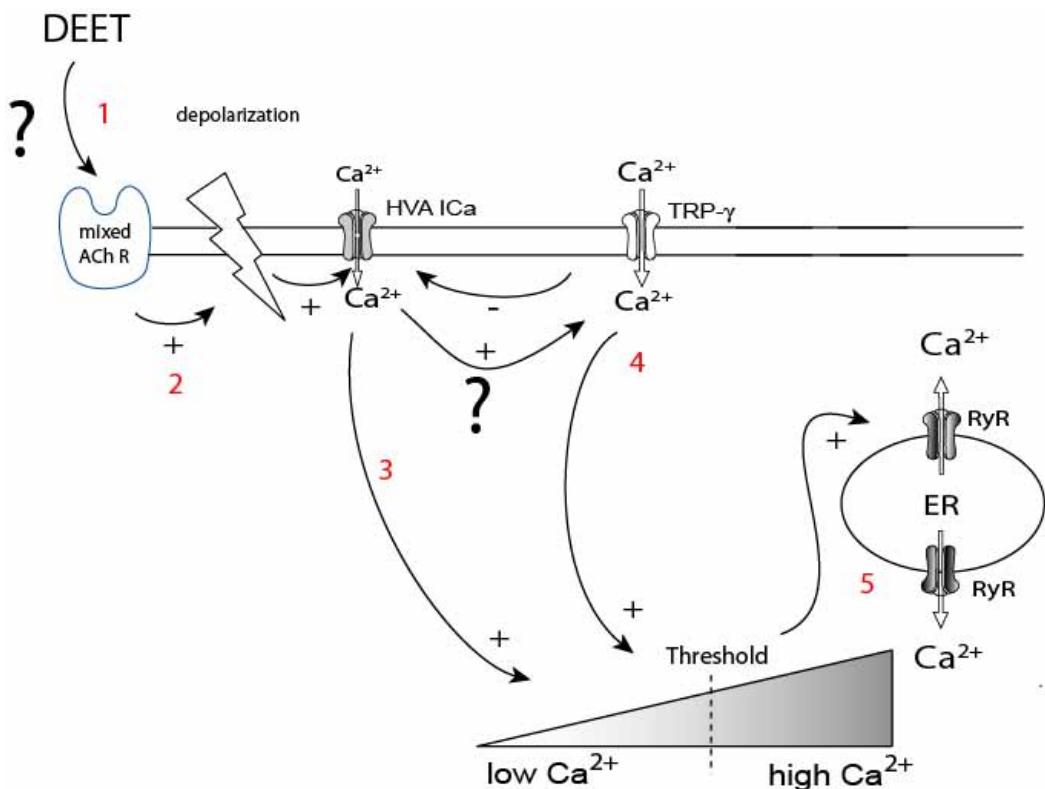


Figure 4.14 : Schéma hypothétique des variations de $[Ca^{2+}]_i$ d'un corps cellulaire de DUM neurone induite par l'application de DEET dans le milieu extracellulaire.

DEET : diethyl-m-toluamide ; mixed AchR : mixed acetylcholine receptor ; HVA ICa : high voltage activating calcium current ; TRP- γ : transient receptor potential g ; RyR : ryanodine receptor ; ER : endoplasmic reticulum.

1,2,3,4,5 : Etapes du modèle proposé d'action du DEET sur la concentration du calcium intracellulaire. Pour la description, se référer au texte.

1. Récepteurs mixtes qui une fois activés, dépolarisent la membrane.
2. Les canaux calciques HVA sensibles à une dépolarisation sont activés et permettent une première entrée de calcium dans le cytoplasme
3. Les canaux calciques TRP- γ peuvent être activés par le calcium libéré par les HVA et permettent une seconde entrée de calcium dans le cytoplasme (hypothèse).

4. En fonction de la concentration en calcium de base, la réponse induite par le DEET implique ou non le CICR (étape 4). Ce qui suggère une notion de seuil de la $[Ca^{2+}]_i$ qu'il faut atteindre pour déclencher un effet neurotoxique en chaîne du DEET

Cette étude est une étape préliminaire qui nous a permis d'établir une hypothèse de travail. En effet, les canaux calciques et les récepteurs candidats identifiés doivent à présent faire l'objet d'une étude plus approfondie visant à caractériser la cible du DEET au niveau du système nerveux central des insectes.

Pour ce faire un protocole multidisciplinaire (patch-clamp, imagerie calcique et biochimie et biologie moléculaire) a été mis en place dans le cadre d'un projet ANR. Ce projet ANR-REACT plus large comporte un axe qui vise à déterminer les cascades d'événements neurophysiologiques et biochimiques impliquées par les répulsifs, molécules d'intérêt en santé publique.

RÉFÉRENCES

- BRAUNIG, P., PFLUGER, H. J. (2001) The unpaired median neurons of insects. *Advances in Insect Physiology* 28 : 185-266
- BROWNLEE, C. (2000) Cellular calcium imaging : so, what's new? *Trends Cell Biol* 10 : 451-7
- BUCKINGHAM, S., LAPIED, B., CORRONC, H., SATTELLE, F. (1997) Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol* 200 : 2685-92
- COURJARET, R., 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
- DEFAIX, A., LAPIED, B. (2005) Role of a novel maintained low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium in pacemaking of insect neurosecretory neurons. *Invert Neurosci* 5 : 135-46
- DUGRAVOT, S., GROLLEAU, F., MACHEREL, D., ROCHEAING, A., HUE, B., STANKIEWICZ, M., HUIGNARD, J., LAPIED, B. (2003) Dimethyl disulfide exerts insecticidal neurotoxicity through mitochondrial dysfunction and activation of insect K(ATP) channels. *J Neurophysiol* 90 : 259-270
- GAUTIER, H. (2007) Etude des effets d'un composé soufré libéré par les Allium, le disulfure de diméthyle, sur les neurones d'insecte et sur l'activité électroencéphalographique de souris. Université d'Angers, Angers
- GAUTIER, H., AUGER, J., LEGROS, C., LAPIED, B. (2007) Calcium-Activated Potassium Channels in Insect Pacemaker Neurons as Unexpected Target Site for the Novel Fumigant Dimethyl Disulfide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* jpet.107.128694v1
- GROLLEAU, F., LAPIED, B. (1995) Separation and identification of multiple potassium currents regulating the pacemaker activity of insect neurosecretory cells (DUM neurons). *J Neurophysiol* 73 : 160-171
- GROLLEAU, F., LAPIED, B. (1996) Two distinct low-voltage-activated Ca^{2+} currents contribute to the pacemaker mechanism in cockroach dorsal unpaired median neurons. *J Neurophysiol* 76 : 963-976
- GROLLEAU, F., LAPIED, B. (2000a) 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 : 1633-48
- GROLLEAU, F., LAPIED, B. (2000b) 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

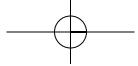
- GROLLEAU, F., LAPIED, B., BUCKINGHAM, S. D., MASON, W. T., SATTELLE, D. B. (1996) Nicotine increases $[Ca^{2+}]_i$ and regulates electrical activity in insect neurosecretory cells (DUM neurons) via an acetylcholine receptor with 'mixed' nicotinic-muscarinic pharmacology. *Neurosci Lett* 220 : 142-6
- GROLLEAU, F., STANKIEWICZ, M., KIELBASIEWICZ, E., MARTIN-EAUCLAIRES, M.-F., LAVIALLE, C., DE VENTE, J., LAPIED, B. (2006) Indirect activation of neuronal noncapacitative Ca^{2+} entry is the final step involved in the neurotoxic effect of *Tityus serrulatus* scorpion B-toxin. *European Journal of Neuroscience* 23 : 1465-1478
- HUE, B., CALLEC, J.-J. (1990) Electrophysiology and pharmacology of synaptic in the central nervous system of the cockroach. In : Huber, I., Masler, E. P., Rao, B. R. (eds) Cockroaches as model for neurobiology. Applications in biochemical research. CRC Press, Boca-Raton, pp 149-168
- LAPIED, B., MALECOT, C. O., PELHATE, M. (1990a) Patch-clamp study of the properties of the sodium current in cockroach single isolated adult aminergic neurones. *J Exp Biol* 151 : 387-403
- LAPIED, B., LE CORRONC, H., HUE, B. (1990b) Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Res* 533 : 132-6
- LAVIALLE-DEFAIX, C., GAUTIER, H., DEFAIX, A., LAPIED, B., GROLLEAU, F. (2006) Differential regulation of two distinct voltage-dependent sodium currents by group III metabotropic glutamate receptor activation in insect pacemaker neurons. *J Neurophysiol* 96 : 2437-50
- LICCIARDI, S., HERVE, J. P., DARRIET, F., HOUGARD, J. M., CORBEL, V. (2006) Toxicity and irritancy of three synthetic repellents (DEET, IR3535 and KBR 3023) against *Aedes aegypti* mosquitoes. *Med Vet Ent.* in press : 000-000
- MESSUTAT, S., HEINE, M., WICHER, D. (2001) Calcium-induced calcium release in neurosecretory insect neurons : fast and slow responses. *Cell Calcium* 30 : 199-211
- N'GUESSAN, R., ROWLAND, M., MOUMOUNI, T. L., KESSE, N. B., CARNEVALE, P. (2006) Evaluation of synthetic repellents on mosquito nets in experimental huts against insecticide-resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 : 1091-7
- PENNETIER, C., CORBEL, V., 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 : 739-44
- PLOTNIKOVA, S. N. (1969) Effector neurons with several axons in the ventral nerve cord of the asian grasshopper *Locusta migratoria*. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 5 : 276-277
- PRICE, D. N., BERRY, M. S. (2006) Comparison of effects of octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. *J Insect Physiol* 52 : 309-19
- ROEDER, T. (2005) Tyramine and octopamine : ruling behavior and metabolism. *Annu Rev Entomol* 50 : 447-77
- SINAKEVITCH, I. G., GEFFARD, M., PELHATE, M., LAPIED, B. (1996) Anatomy and targets of Dorsal Unpaired Median neurones in the Terminal Abdominal Ganglion of the male cockroach *Periplaneta americana* L. *J Comp Neurol* 367 : 147-163
- SINAKEVITCH, I. I., GEFFARD, M., PELHATE, M., LAPIED, B. (1995) Octopaminergic dorsal unpaired median (DUM) neurones innervating the colletorial glands of the female cockroach *Periplaneta americana*. *J Exp Biol* 198 : 1539-44
- STEVENSON, P. A., SPORHASE-EICHMANN, U. (1995) Localization of octopaminergic neurones in insects. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 110 : 203-15
- VERSCHOYLE, R. D., BROWN, A. W., NOLAN, C., RAY, D. E., LISTER, T. (1992) A comparison of the acute toxicity, neuropathology, and electrophysiology of *N,N*-diethyl-m-toluamide and *N,N*-dimethyl-2,2-diphenylacetamide in rats. *Fundam Appl Toxicol* 18 : 79-88
- VOETS, T., DROOGMANS, G., WISSENBACH, U., JANSSENS, A., FLOCKERZI, V., NILIUS, B. (2004) The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 430 : 748-54
- WEILL, M., CHANDRE, F., BRENGUES, C., MANGUIN, S., AKOGBETO, M., PASTEUR, N., GUILLET, P., RAYMOND, M. (2000) The kdr mutation occurs in the Mopti form of *Anopheles gambiae* s.s. through introgression. *Insect Molecular Biology* 9 : 451-455
- WICHER, D. (2001) Peptidergic modulation of insect voltage-gated $Ca(2+)$ currents : role of resting $Ca(2+)$ current and protein kinases A and C. *J Neurophysiol* 86 : 2353-62

- WICHER, D., PENZLIN, H. (1997) Ca₂₊ currents in central insect neurons : electrophysiological and pharmacological properties. *J Neurophysiol* 77 : 186-99
- WICHER, D., WALTHER, C., 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
- WICHER, D., MESSUTAT, S., LAVIALLE, C., LAPIED, B. (2004) A new regulation of non-capacitative calcium entry in insect pacemaker neurosecretory neurons : Involvement of arachidonic acid, NO-guanylyl cyclase/cGMP and cAMP. *J Biol Chem*
- WICHER, D., BERLAU, J., WALTHER, C., BORST, A. (2006a) Peptidergic counter-regulation of Ca(2+)- and Na(+) -dependent K(+) currents modulates the shape of action potentials in neurosecretory insect neurons. *J Neurophysiol* 95 : 311-22
- WICHER, D., AGRICOLA, H. J., SCHONHERR, R., HEINEMANN, S. H., DERST, C. (2006b) TRPgamma channels are inhibited by cAMP and contribute to pacemaking in neurosecretory insect neurons. *J Biol Chem* 281 : 3227-36

Annexe 8: Rev Prat 2005, 55 (8), 841-848.

Paludisme : Où en est la prophylaxie d'exposition ?

Lundwall E, Pennetier C, Corbel V, DeGentile L & Legros F



Paludisme : où en est la prophylaxie d'exposition ?

Associée à la prévention médicamenteuse, la protection des piqûres d'anophèles est indispensable mais non suffisante dans les zones à risque de paludisme. Les répulsifs sont nombreux, mais d'efficacité et d'utilisation très variables. Les vêtements imprégnés de perméthrine sont intéressants, mais seule la moustiquaire imprégnée a fait la preuve de son efficacité dans la prévention du paludisme.

Éric Lundwall*, Cédric Pennetier**, Vincent Corbel**, Ludovic de Gentile***, Fabrice Legros****

La meilleure définition d'un répulsif est comportementale : « Sur une surface répulsive les insectes passent moins de temps et sont présents en quantité moindre que sur une surface comparable disponible. »¹ Un répulsif peut simplement protéger de la piqûre, et toujours de façon relative. L'insecticide, comme son nom l'indique, provoque la mort de l'insecte. Le DDT (dichloro-diphényle-trichloro-éthane) et la famille des pyréthrinoïdes ont la particularité d'induire un effet *knock-down*, qui « assomme » le moustique : les perturbations physiologiques induites par ces molécules sont à l'origine d'incoordinations des mouvements, suivies d'une paralysie et de la mort de l'insecte.

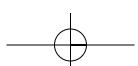
Les répulsifs suscitent depuis peu un intérêt accru des chercheurs en entomologie médicale, et plus particulièrement en paludologie, pour les deux raisons suivantes.

On accorde de plus en plus d'importance aux propriétés répulsives des insecticides. En effet, outre sa toxicité vis-à-vis de l'insecte, un insecticide peut également avoir pour celui-ci un effet irritant de contact (par contact avec les

tarses) et un effet répulsif à distance (les récepteurs olfactifs sont alors mis en jeu). Ces deux dernières actions, souvent regroupées sous le terme d'effet excitorépulsif ou conduite d'évitement, provoquent la fuite de l'insecte ; elles ont été notamment observées pour le DDT et les pyréthrinoïdes.² Lorsque l'effet excitorépulsif de l'insecticide prend le dessus sur son effet *knock-down* (soit que celui-ci soit intrinsèquement faible [DDT p. ex.], soit que l'insecte soit devenu résistant), on considérait autrefois que l'insecticide devenait incapable d'interrompre la transmission de la maladie. C'est ainsi que furent arrêtées les campagnes d'aspersion par le DDT du programme global d'éradication du paludisme – peut-être à tort : on considère aujourd'hui que la simple propriété excitorépulsive de l'insecticide peut suffire à réduire le risque de piqûre, voire la transmission de la maladie.^{3,4}

En complément de la moustiquaire imprégnée, les répulsifs confèrent une protection individuelle pour les voyageurs qui restent exposés au risque de transmission du paludisme par les anophèles en fin de soirée. Les pics d'activité des anophèles

* Centre de conseils aux voyageurs, hôpital Avicenne, 93009 Bobigny Cedex. ** Laboratoire de lutte contre les insectes nuisibles, IRD, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5. *** Service de parasitologie, CHU, 49933 Angers Cedex 9. **** Centre national de référence de l'épidémiologie du paludisme d'importation et autochtone, Université Paris 6, 15, rue de l'École de Médecine, 75270 Paris Cedex 06. Courriel : eric.lundwall@avc.ap-hop-paris.fr



PALUDISME OÙ EN EST LA PROPHYLAXIE D'EXPOSITION ?

africains vecteurs du paludisme arrivent d'abord vers 1 heure du matin puis vers 5-6 heures ; ces horaires sont plus ou moins décalés selon les espèces vectrices, c'est la variabilité interspécifique : ainsi, le pic d'agressivité d'*Anopheles nili* survient à 22 heures. Et dans un pays asiatique comme le Pakistan, le pic d'agressivité d'*Anopheles culicifacies*, *An. stephensi*, *An. nigerrimus* et *An. pulcherrimus* se situe entre 21 heures et 23 heures.⁵ Certaines espèces d'anophèles exophages comme *An. sundaicus* piquent en Indonésie le soir, à une heure où la plupart des gens sont à l'extérieur.⁶

Se pose alors la question de l'efficacité des répulsifs cutanés vis-à-vis des différentes espèces d'anophèles : est-elle absolue ou relative ? Combien de temps dure-t-elle ? À quel coût ? Avec quelle observance ? Et avec quel degré de preuve d'efficacité clinique vis-à-vis de la maladie ? Bref, le répulsif cutané a-t-il sa place dans la prévention du paludisme ?

PRINCIPAUX RÉPULSIFS

Les principales matières actives répulsives cutanées de synthèse sont, par ordre chronologique de mise sur le marché :

- le diméthylphthalate (années 1920, d'origine nord-américaine) ;
- l'éthyl-hexanediol (EHD) [années 1930, d'origine nord-américaine] ;
- le diéthyl-toluamide (DEET) [années 1950, d'origine nord-américaine] ;
- l'éthyl-butyl-acétyl-amino-propionate (IR 3535) [années 1970, d'origine allemande] ;
- l'icardine ou hydroxyléthyl-isobutyl pipéridine carboxylate (HIPC ou KBR 3023) [années 1990, dérivé de la pipéridine d'origine allemande] ;
- le citriodiol ou p-menthane diol (PMD) ou Mosiguard (années 1990, d'origine anglaise).

Du point de vue réglementaire, les répulsifs relevaient jusqu'à présent, en France, de la peu contraignante classe des cosmétiques : pas de test d'efficacité exigé, dossier toxicologique à minima que les formulateurs doivent tenir à la disposition des autorités sanitaires. Cela est en train de basculer du fait de la nouvelle réglementation européenne sur les biocides, comprenant insecticides et répulsifs, qui se met progressivement en place. C'est ainsi que le diméthylphthalate et l'éthyl-hexanediol sont amenés à disparaître en 2006, car ces produits n'ont pas été « notifiés » par les fabricants auprès des autorités européennes.

Sont surtout présents sur le marché français l'IR 3535, le DEET et le citriodiol.

QUELLE EFFICACITÉ RÉELLE ?

Jusque dans les années 1950, l'armée américaine recourrait à un mélange de diméthylphthalate et d'éthyl-hexanediol, afin d'élargir au maximum le spectre d'activité

répulsive. En 1957, ce mélange fut supplanté par le DEET isolément, celui-ci s'étant révélé « remarquablement polyvalent, égal ou supérieur au répulsif considéré jusque-là comme le plus efficace contre chaque espèce d'insectes ».⁷

Puis surgit une exception de taille : un test publié en 1977 montra que le diméthylphthalate était plus efficace que le DEET vis-à-vis d'une espèce du genre *Anopheles*, et que l'éthyl-hexanediol était, lui, plus efficace vis-à-vis de deux espèces d'anophèles⁸ (tableau 1). La parade : recourir contre l'anophèle à une concentration d'au moins 50 %, l'anophèle tolérant le DEET à basse concentration. C'est ainsi qu'Ultrathon, répulsif dosé à 35 % de DEET que la firme 3M produit pour l'armée américaine, ne protège d'*Anopheles dirus* que pendant... 40 minutes, contre plus de 3 heures de protection pour une concentration de DEET de 50 %.⁹ (tableau 2). Pourtant, Ultrathon a fait l'objet d'une formulation spéciale, avec adjonction au DEET d'un polymère censé ralentir son évaporation et son passage transcutané – afin d'apporter la même durée d'efficacité que du DEET dosé à 75 %. On peut tirer deux enseignements de ces études : jusqu'à preuve du

Efficacités des répulsifs, DEET, diméthylphthalate, EHD, contre deux variétés d'anophèles et une d'*Ædes*

RÉPULSIF	DURÉE DE PROTECTION EN MINUTES*		
	<i>Ædes aegypti</i>	<i>Anopheles quadrimaculatus</i>	<i>Anopheles albimanus</i>
DEET	426	96	87
Diméthyl phthalate	53	415	42
EHD	130	380	158

Tableau 1 * Moyenne de 6 tests chez 6 sujets, appliquant 250 mg du répulsif sur l'avant-bras (d'après la réf. 8). DEET : diéthyl-toluamide ; HED : éthyl hexanediol.

Protection offerte par des concentrations croissantes de DEET vis-à-vis d'*Anopheles dirus* et d'*Ædes albopictus*

CONCENTRATION DE DEET (nom commercial)	DURÉE DE PROTECTION MOYENNE EN MINUTES*	
	<i>Anopheles dirus</i>	<i>Ædes albopictus</i>
20 % (Autan ancienne formule)	5,0 ± 4,6	> 180
35 % (Ultrathon)	40,0 ± 8,2	> 240
50 %	Non calculée**	> 210

Tableau 2 * Avant-bras protégés jusqu'à ce que 3 piqûres soient enregistrées (d'après la réf. 9). ** Non calculée, parce que des tests ont été arrêtés après 180 minutes sans 3 piqûres. DEET : diéthyl-toluamide .

Nombre total d'anophèles se posant sur l'homme en fonction du répulsif utilisé, lors de tests de terrain menés chez 8 sujets pendant 96 nuits au Burkina Faso

ESPÈCE D'ANOPHÈLE	SUJETS AVEC RÉPULSIF			SUJETS TÉMOINS	TOTAL
	DEET	IR 3535	KBR 3023		
■ <i>An. funestus</i>	133	162	60	272	627
■ <i>An. gambiae</i>	6 454	8 891	3 485	27 231	46 061
■ <i>Anopheles nigli</i>	217	274	117	1259	1867
■ <i>An. pharoensis</i>	13	18	8	65	104
■ Total	6 817	9 345	3 670	28 827	48 659

Tableau 3 DEET : diéthyl-toluamide ; IR3535 : éthyl-butyl-acétyl-amino-propionate ; KBR 3023 : icaridine ou hydroxyléthyl isobutyl pipéridine carboxylate (d'après la réf. 14).

contraire, la quantité de matière active prime sur la formulation ; surtout, il est impossible d'extrapoler l'efficacité d'un répulsif d'une espèce d'arthropode à l'autre et il convient de multiplier les tests.

Une étude récente, réalisée en laboratoire sur *Aedes aegypti* et publiée dans le *New England Journal of Medicine*, a remis à leur juste place la plupart des répulsifs dits naturels¹⁰ type citronnelle : ils offrent une durée de protection variant en moyenne de 3 à 20 minutes, contre plus de 5 heures pour du DEET dosé à 23,8 %. Seul le citriodiol dosé à 20 % se montre efficace pendant 2 heures – à peine plus que du DEET dosé à 6,65 %. L'IR 3535 dosé à 7,5 % est 4 fois moins efficace que du DEET dosé à 4,75 % (22,9 contre 88,4 min).

Mais vis-à-vis de l'anophèle ?

Une étude réalisée en Tanzanie chez 6 sujets pendant 3 nuits a montré que la durée d'efficacité du citriodiol dosé à 50 % est de près de 7 heures vis-à-vis d'*Anopheles gambiae* et *An. funestus* – proche de celle du DEET également dosé à 50 %.¹¹ Mais les concentrations de citriodiol disponibles sur le marché sont au maximum de 30 et 40 % ; et un test de laboratoire sur *An. stephensi* fait état d'une durée d'efficacité de 11 à 12 heures pour du citriodiol dosé à 20 et 30 % contre... 30 heures pour du DEET dosé à 50 %.¹²

Quant à l'IR 3535, dans un test de laboratoire, *An. dirus* s'y montre moins sensible qu'au DEET : 3,8 heures d'efficacité seulement contre 5,8 heures¹³ – alors que les mêmes solutions dosées à 20 % d'IR 3535 et de DEET font preuve d'une efficacité très proche vis-à-vis d'*Aedes aegypti* (9,8 contre 9,7 h) et de *Culex quinquefasciatus* (13,7 contre 12,7 h)...

Enfin, une impressionnante étude de terrain portant sur 8 sujets pendant 96 nuits au Burkina Faso, avec plus de 49 000 moustiques collectés dont 95 % d'*Anopheles gambiae*, vient d'être publiée : elle compare l'efficacité du DEET, de l'IR 3535 et de l'icaridine/KBR 3023.¹⁴ L'ED₉₅, c'est-à-dire la dose de répulsif à appliquer sur la peau pour repousser efficacement 95 % d'*An. gambiae*, est proche et minime pour le DEET et l'icaridine/KBR 3023 : respecti-

vement 0,09 et 0,08 mg/cm² contre 0,2 mg/cm² pour l'IR3535 – ce qui traduit clairement la moindre sensibilité d'*An. gambiae* à l'IR 3535. Surtout, la rémanence sur la peau de l'icaridine/KBR 3023 est supérieure à celles du DEET et de l'IR 3535, avec une demi-vie d'environ 4 heures pour l'icaridine/KBR 3023 contre 3 heures pour le DEET et l'IR 3535. L'icaridine/KBR 3023 se révèle globalement plus efficace vis-à-vis des différentes espèces d'anophèles (tableau 3).

The Medical Letter a consacré en 2003 une synthèse aux répulsifs d'insectes (la dernière remontait à 1989...):^{15,16} à côté du DEET, le seul nouveau principe actif véritablement prometteur apparu depuis 1957 semble être l'icaridine/KBR 3023, sachant que d'autres dérivés de la pipéridine sont en cours de développement.¹⁷

Tenir compte des conditions réelles d'utilisation...

Il est à noter que dans l'étude de terrain du Burkina Faso, la quantité de répulsif appliquée sur la peau est standardisée. Or, en conditions réelles d'utilisation, la quantité appliquée varie d'un répulsif à l'autre, d'une forme galénique à l'autre (gel en tube ou solution en spray p. ex.) : la concentration en matière active du produit utilisé devient alors un élément essentiel. Ainsi, dans un test de terrain réalisé la nuit dans le Queensland, les sujets n'ont appliqué en moyenne que 0,98 mg/cm² d'un gel dosé à 35 % de DEET, contre 1,25 mg/cm² d'une solution dosée à 9,3 % d'icaridine/KBR 3023 et 1,67 mg/cm² d'une solution dosée à 19,2 % d'icaridine/KBR 3023 : la protection vis-à-vis de *Verrallina lineata*, *Anopheles farauti*, etc. fut supérieure à 94,7 % pendant plus de 9 h pour l'icaridine/KBR 3023 dosé à 19,2 %, supérieure à 95 % pendant plus de 7 h pour le gel de DEET dosé à 35 %, mais supérieure à 95 % pendant seulement 2 h pour l'icaridine/KBR 3023 dosé à 9,3 %.¹⁸ En conditions réelles d'utilisation, l'icaridine/KBR 3023 à une concentration d'environ 20 % semble donc également offrir une protection plus longue.

PALUDISME OÙ EN EST LA PROPHYLAXIE D'EXPOSITION ?

Acceptabilité de deux formulations répulsives par des soldats australiens au Timor oriental

PRODUIT	NOMBRE DE RÉPONSES (%)		
	Désagréable : collant , gras	Irritant : sensation de brûlure	Indifférent
Spray à 19,2 % d'Icaridine/ KBR 3 023	10 (2,8)	42 (11,9)	98 (27,7)
Gel à 35 % de DEET	112 (31,7)	79 (22,3)	12 (3,4)

Tableau 4 À partir d'un total de 353 réponses (d'après la réf. 19). DEET : diéthyl-toluamide ; KBR 3 023/icaridine : hydroxylethyl isobutyl pipéridine carboxylate.

Nombre et distribution des piqûres d'*Anopheles arabiensis* chez 8 sujets assis dehors pendant 5 soirées entre 18h30 et 22h30, selon que les pieds et les chevilles étaient traités par du DEET ou non

PARTIE DU CORPS	NOMBRE DE PIQÜRES (%)	
	Sujets avec DEET	Sujets sans DEET
Pieds et chevilles	0 (0,0)	421 (81,1)
Jambes	141 (88,1)	85 (16,4)
Bras	4 (2,5)	7 (1,4)
Tête/thorax	15 (9,4)	6 (1,2)
Total	160 (100)	519 (100)
% protection	69,2	

Tableau 5 DEET : diéthyl toluamide (d'après la réf. 21).

Comme pour le médicament, l'observance est un élément essentiel dans le choix d'un répulsif. Une étude concernant les militaires australiens au Timor oriental a montré que seulement 20 % utilisaient le gel dosé à 35 % de DEET qui leur était fourni gratuitement ; beaucoup préféraient acheter localement des sprays.¹⁹ On leur demanda de comparer pendant 2 semaines, à raison de 2 applications par jour, un gel dosé à 35 % de DEET et un spray dosé à 19,2 % d'icaridine KBR 3023 : ce dernier fut mieux accepté que le DEET, la sensation de brûlure notée pour l'icaridine KBR 3023 peut être liée à l'éthanol utilisé comme solvant (tableau 4). Toujours est-il que, selon une publication récente, l'observance des militaires américains en Afghanistan pour l'utilisation d'un répulsif cutané (gel dosé à 35 % de DEET) est aussi mauvaise que celle de la chimioprophylaxie pendant le séjour et au retour : autour de 30 %.²⁰ L'homme est souvent plus sensible à la nuisance du moustique qu'à la crainte de la maladie vectorielle ; l'anophèle fait peu de bruit, et sa piqûre est souvent indolore...

... et du comportement des anophèles

En pratique, il conviendrait de tenir compte non seulement de l'habitus de l'homme, mais aussi du comportement des anophèles vecteurs. Une étude sud-africaine publiée en 2001 a montré que 8 sujets assis exposés sans répulsif à *Anopheles arabiensis* pendant 5 soirées entre 18h30 et 22h30, vêtus d'un simple bermuda, subissent 519 piqûres, dont 81 % au niveau des pieds et des chevilles.²¹ Une application de DEET à 15 % limitée aux pieds et aux chevilles devrait provoquer un déplacement des piqûres vers le reste du corps, d'autant que l'efficacité d'un répulsif est limitée à 4 cm de son lieu d'application.²² Or, il n'en est rien, et le nombre de piqûres chute à 160 : protection de 69 % donc, avec 88 % de piqûres au niveau des jambes (tableau 5). Il semble donc indispensable d'étudier le comportement trophique (c'est-à-dire les zones du corps humain préférées pour la piqûre) afin de cibler la protection.

Enfin, un test montre que certaines espèces d'anophèles tolèrent particulièrement bien les répulsifs en général. En Australie, du DEET dosé à 35 % et de l'icaridine/KBR 3023 dosé à 19,2 % n'ont offert une protection supérieure à 95 % vis-à-vis d'*Anopheles meraukensis* et *bancroftii* que pendant 1 heure.²³

Quelle efficacité clinique démontrée en prévention du paludisme ?

En conclusion de cette efflorescence de publications récentes, si une tendance se dégage en faveur de la supériorité de l'icaridine/KBR 3023 vis-à-vis de l'anophèle, cette supériorité n'existe que pour une concentration d'au moins 19,2 %, et elle reste toute relative : certains anophèles semblent peu sensibles à tous les répulsifs.

CE QUI EST NOUVEAU

- Le développement de moustiquaires imprégnées « longue durée », avec une rémanence de plusieurs années.
- Face à la menace que constitue l'apparition de résistances aux pyréthrinoïdes, et en l'absence de nouvelles familles d'insecticides, la recherche en santé publique s'oriente vers une meilleure utilisation de l'existant : associations d'insecticides à modes d'action différents, associations insecticides/répulsifs...
- En matière de protection individuelle, une meilleure évaluation clinique de l'efficacité des répulsifs cutanés vis-à-vis des anophèles. À côté du DEET, qui reste le produit de référence un demi-siècle après sa découverte, apparaît une classe prometteuse de produits répulsifs dérivés de la pipéridine.

Principales marques de sprays répulsifs cutanés à visée « tropicale » vendus en pharmacie au 4^e trimestre 2004, par ordre décroissant d'unités vendues

MARQUE (laboratoire)	PRINCIPE ACTIF (concentration)
Cinq sur cinq Tropic (Bayer)	IR 3535 (25 %)
Insect Écran Peau Adulte (Osler)	DEET (50 %)
Moustifluid Zones Infestées (Merck MF)	IR 3535 (20 %)
Mousticologne Zones Infestées (Clément-Thekan)	DEET (20 %) + EHD (15 %)
Prebutix lotion haute protection (Pierre Fabre)	IR 3535 (25 %)
Repel Insect Adulte (Cattier)	DEET (50 %)
Moustidose lotion tropicale (Gilbert)	DEET + EHD (40 %)*
Mouskito Tropic (Gifrer)	DEET (30 %)
Mosiguard Naturel (Katadyn)	Citriodiol (40 %)

Tableau 6 Les 5 premières marques citées représentant plus de 90 % de ce marché (source IMS). * DEET + EHD = 40 %. EHD : éthyl hexanediol ; DEET : diéthyl-toluamide ; IR 3535 : éthyl-butyl-acétyl-amino-propionate.

Et à côté de cette relative richesse en évaluation récente des répulsifs sur le nombre de piqûres, quelles sont les données objectives d'efficacité clinique des répulsifs sur la prévention du paludisme ? Il n'y a qu'une seule étude publiée,¹ réalisée dans un camp de réfugiés au Pakistan. Le produit testé n'était pas un répulsif classique, mais un « savon » – un pain solide plutôt – contenant 20 % de DEET et 0,5 % de perméthrine. Cette étude contre placebo, concernant 1 148 sujets pendant 6 mois, ne mit pas en évidence de réduction du nombre de cas de paludisme à *Plasmodium vivax*, mais en revanche une diminution de 56 % du nombre d'éisodes à *P.falciparum* dans le bras savon « actif ».

Quels produits répulsifs les voyageurs français en zone d'endémie utilisent-ils ? On peut avoir une indication à partir des ventes réalisées en pharmacie pendant un trimestre d'hiver ; 88 % des 176 000 unités vendues au dernier trimestre 2004 sont des sprays, avec un large éventail de matières actives et de concentrations (tableau 6).

CES PRODUITS SONT-ILS TOXIQUES ?

La toxicité du DEET est la plus documentée, notamment chez l'enfant où 10 cas d'encéphalopathie ont été publiés. Mais une synthèse canadienne parue en 2003 remet en cause la méthodologie de ces publications :²⁴ aucun cas n'a été décrit depuis 1992 ; une origine virale n'a été éliminée dans aucun des 10 cas ; la grande étude publiée sur

les données recueillies par les centres antipoison américains de 1985 à 1989 est plutôt rassurante ;²⁵ enfin, 23 à 29 % des enfants nord-américains sont exposés au DEET alors que dans la population générale, 3 à 5 % des enfants connaissent un épisode convulsif : une relation de cause à effet est difficile à établir.

Malgré cela, les recommandations publiées par la Société de pédiatrie canadienne en 2003 sont très prudentes et préconisent de n'utiliser que des concentrations de DEET inférieures à 10 % jusqu'à l'âge de 12 ans.

– De 6 mois à 2 ans : une seule application par jour. Une 2^e application est possible si l'enfant est exposé pendant plus de 4 heures, si le risque de maladie est important, si l'enfant s'est baigné.

– De 2 ans à 12 ans : jusqu'à 3 applications par jour. Notons que ces recommandations visent d'abord *Culex*, *Ædes* et la prévention locale du *West Nile* ; or, nous avons vu que le DEET à une concentration de 10 % est peu efficace contre l'anophèle.

Quant à la grossesse, une étude randomisée en double aveugle incluant 897 femmes enceintes en Thaïlande a montré que l'application de DEET n'avait aucune incidence négative aux 2^e et 3^e trimestres de la grossesse.²⁶ Et les recommandations des CDC (*Centers for diseases control and prevention*) d'Atlanta pour les voyageurs, modifiées en juillet 2003, sont beaucoup plus larges que celles des autorités canadiennes : le DEET y est conseillé à la concentration optimale de 50 % tout au long de la grossesse, dont le premier trimestre, lors de l'allaitement, et dès l'âge de 2 mois, en évitant l'application sur les mains – que l'enfant porte facilement à la bouche.²⁷ Le DEET est d'ailleurs commercialisé aux États-Unis jusqu'à une concentration de 100 %.

D'autre part, des éruptions bulleuses ont été décrites après application de DEET au niveau du pli du coude et du creux poplité,^{28,29} notamment après une nuit passée avec le membre en flexion. Dernier inconvénient : le DEET est un solvant, il peut dissoudre les verres de montres, les vernis et... les filtres solaires : en cas d'utilisation conjointe, le DEET s'applique en second, et l'indice de protection du produit solaire diminue d'environ un tiers.³⁰

Toutefois, 40 ans d'utilisation et environ 8 milliards d'applications humaines plaident en faveur du profil de sécurité du DEET.¹⁰

Tous les autres répulsifs sont beaucoup moins documentés. Les publications sur la toxicité de l'IR 3535 et du citriodiol sont rares. Celui-ci est commercialisé en France sans limite d'âge, il n'y a pas d'étude épidémiologique sur son application cutanée et son ingestion.²⁴ Il s'agit d'un métabolite du menthol, utilisé comme additif alimentaire et présent dans de nombreuses préparations : les autorités sanitaires canadiennes sont rassurantes mais, même si la forme commercialisée localement est concentrée à 10 %, elles recommandent de l'utiliser à partir de l'âge de 3 ans et de limiter à 2 le nombre d'applications quotidiennes.³¹

PALUDISME OÙ EN EST LA PROPHYLAXIE D'EXPOSITION ?

Efficacités comparées du DEET sur la peau et de la perméthrine sur les vêtements, utilisés séparément et en association

CIBLE	NOMBRE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	DEET	PERMÉTHRINE	DEET + PERMÉTHRINE
Culicoïdes	6	+++	++	++++
Simulies	4	+++	++	++++
Poux de corps	4	+	+++	++++
Thrombiculides	8	+++	++	++++
Puces	4	+++	++	++++
Punaises	4	+	++	++
Moustiques	21	+++	++	++++
Phlébotomes	6	+++	++	++++
Tiques dures	8	++	+++	++++
Tiques molles	3	++	+++	++++
Mouche tsé-tsé	4	+++	++	++++

Tableau 7 DEET : diéthyl toluamide. ++++ : excellente ; +++ : très importante ; ++ : importante ; + : modérée à faible (d'après la réf. 39).

L'IR 3535, analogue de lalanine, est également commercialisé sans limite d'âge par certains fabricants ; d'autres préconisent un âge minimum de 12 mois pour une concentration de 10 % et de 30 mois pour une concentration de 20 %; il n'y a pas d'étude publiée concernant son innocuité chez l'homme.³² Quant à l'icaridine/KBR 3023, il n'est pas indiqué avant l'âge de 2 ans, mais cela semble aussi relever d'un principe de précaution.

Chez l'enfant, un répulsif cutané n'est utilisable que pour de brèves périodes : plus d'un tiers des parents ne tiendraient pas compte de la notice d'utilisation;³³ même correctement appliqué, le répulsif ne protège pas toujours à 100 % de la piqûre de l'anophèle même la première heure, il peut donner une fausse impression de sécurité, et on manque de recul sur la toxicité de nombreux produits. De ce point de vue, les choses ont peu évolué depuis la synthèse que *La revue Prescrire* a consacrée au sujet il y une dizaine d'années.³⁴

PORT DE VÊTEMENTS IMPRÉGNÉS

L'étude sur l'observance des militaires américains en Afghanistan²⁰ révèle une bien meilleure acceptabilité des uniformes imprégnés de perméthrine : 82 %.

La protection passive qu'offre l'imprégnation des vêtements par la perméthrine permet donc une meilleure observance, grâce notamment à la rémanence de l'insecticide malgré plusieurs lavages. Et le niveau de preuve de l'efficacité de vêtements imprégnés de perméthrine est assez élevé. Une étude randomisée en double aveugle chez 172 militaires pendant plus d'un mois a montré qu'en Colombie le seul port de vêtements imprégnés permettait de prévenir le paludisme dans 75 % des cas :³⁵ 3 cas de paludisme à *Plasmodium vivax* dans le bras perméthrine, alors qu'il y eut dans le bras placebo 9 cas à *P. vivax*, 1 cas à

P.falciparum et 1 cas à *P. vivax* et à *P.falciparum*. Mais le port de vêtements imprégnés par les militaires français en Côte d'Ivoire, s'il a permis une certaine protection des piqûres d'anophèles, n'a pas diminué l'incidence du paludisme.³⁶

En pratique, la dose de perméthrine efficace sur un vêtement vis-à-vis de l'anophèle est de 150 mg/m², sachant qu'un pantalon, ou une chemise, ou 10 paires de chaussettes représentent environ 1 m². Si l'on vise une efficacité persistante après 5 lavages, il faut partir d'une concentration initiale de 1 g/m².

Chez l'enfant, les vêtements imprégnés ne peuvent être conseillés que pour de brèves périodes, car on ne dispose d'aucune étude épidémiologique. Cela dit, le profil toxicologique de la perméthrine est bien connu et rassurant :³⁷ il existe aux États-Unis et en Espagne une crème scabicide dosée à 5 % de perméthrine (Elimite), qui n'est pas contre-indiquée chez le nourrisson et la femme enceinte.³⁸

Le DEET et la perméthrine restent les deux produits de référence pour traiter, respectivement, la peau et les vêtements, car il s'agit des produits les plus documentés³⁹ (tableau 7).

LES MOUSTIQUAIRES IMPRÉGNÉES

Le niveau de preuve clinique dans le cadre de la prévention du paludisme est plus élevé pour les moustiquaires imprégnées d'insecticide (deltaméthrine, perméthrine).⁴⁰ Elles procurent une protection personnelle au dormeur, et leurs propriétés insecticides protègent également la communauté (effet de masse) si elles sont utilisées avec une couverture d'au moins 80 % de la population. Constituant l'outil majeur de prévention du paludisme au niveau communautaire, la moustiquaire imprégnée est la stratégie de lutte recommandée par l'Organisation mondiale de la santé.⁴¹ Récemment, sont apparues de nouvelles technologies qui permettent de

développer des moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (Olyset [Sumitomo] ; Permanet [Vestergard]), avec une rémanence de plusieurs années et une résistance à 20 lavages.

Les pyréthrinoïdes sont les seuls insecticides recommandés pour l'imprégnation des moustiquaires en raison de leur rapidité de mode d'action, de leur effet excitorépulsif, des faibles doses d'utilisation, et de leur innocuité pour l'homme.⁴² Cependant, l'utilisation massive de pesticides agricoles, notamment contre les ravageurs du coton et du riz, a entraîné la sélection de résistances aux pyréthrinoïdes chez plusieurs espèces de moustiques, dont des vecteurs majeurs du paludisme en Afrique.⁴³

Aujourd'hui, la résistance des anophèles aux pyréthrinoïdes impliquant le gène *Kdr* (*knock down resistance*) n'a pas réduit l'efficacité collective des moustiquaires imprégnées, car les femelles résistantes sont moins irritées par les pyréthrinoïdes que les moustiques sensibles de la même espèce, et absorbent par conséquent des doses plus importantes d'insecticides au niveau des tarses.⁴⁴ Cependant, ce contact prolongé du moustique avec la moustiquaire imprégnée lui permet de prendre plus facilement un repas sanguin,⁴⁵ ce qui représente pour le dormeur un risque de transmission d'agents pathogènes.

Face à la menace que constitue le développement de cette résistance chez les insectes vecteurs, il est indispensable d'envisager de nouvelles stratégies permettant de maintenir une efficacité maximale des moustiquaires. Une possibilité est d'associer différents insecticides à modes d'action différents, soit en mélange,^{46,47} soit en alternance dans le temps (rotation) ou dans l'espace (mosaïque).⁴⁸ Les mélanges d'insecticides font actuellement l'objet d'un regain d'intérêt, tant en agriculture qu'en santé publique, depuis la mise en évidence d'interactions synergistes entre des pyréthrinoïdes et des carbamates ou des organophosphorés vis-à-vis d'insectes fortement résistants aux pyréthrinoïdes.⁴³ Toutefois, les risques de toxicité des mélanges d'insecticides pour l'homme et la faune non cible demeurent, à ce jour, inconnus, ce qui limite encore leur utilisation en santé publique.

Une autre piste de recherche consiste à reconstituer, à partir de composés non pyréthrinoïdes, un produit insecticide ayant les caractéristiques propres aux pyréthrinoïdes, à savoir leur faible toxicité, leur rapidité d'action à faible dose et leur effet irritant. Une étude récente en laboratoire a montré que le mélange d'une faible dose d'un carbamate comme le propoxur et de DEET avait les

POUR LA PRATIQUE

- Avant la mise sous moustiquaire, il est possible de réduire le nombre de piqûres d'anophèles grâce au port de vêtements imprégnés de perméthrine (bonne observance) et grâce à l'application sur la peau d'un répulsif fortement dosé en matière active (moins bonne observance), avec par ordre décroissant d'efficacité : DEET à 50 % ou icaridine/KBR 3023 à 20 %, puis citriodiol à 40 % et IR 3535 à 25 %.
- Là où la densité des anophèles est grande, ni le port de vêtements imprégnés ni l'application d'un répulsif cutané n'ont fait la preuve d'une diminution du risque d'impaludation, et la chimioprophylaxie est toujours indispensable.

mêmes caractéristiques qu'une CL₁₀₀ (concentration létale pour 100 % des moustiques exposés) de deltaméthrine, en raison d'une forte synergie entre ces deux composés.⁴⁹ Les recherches en cours sur l'efficacité de matériaux traités (vêtements et moustiquaires) permettent d'envisager une utilisation de mélanges d'insecticides non pyréthrinoïdes et de répulsifs dans le cadre de la lutte contre les vecteurs du paludisme.

CONCLUSION

Seule la moustiquaire imprégnée a véritablement fait la preuve de son efficacité clinique dans le cadre de la prophylaxie d'exposition du paludisme. Pour la période précédant la « mise sous moustiquaire », l'utilisation adéquate de répulsifs cutanés suffisamment dosés et le port de vêtements imprégnés d'insecticide réduisent le nombre de piqûres sans qu'il soit possible, faute de données disponibles, de garantir une réduction du risque d'impaludation bien que cela semble vraisemblable. À l'inverse, là où la densité des anophèles est très grande (ce qui concerne peu en règle générale le touriste « classique »), le port de vêtements imprégnés d'insecticide et l'application d'un répulsif cutané ne peuvent vraisemblablement pas suffire à diminuer l'incidence du paludisme, ce qui renforce bien le principe de complémentarité entre prophylaxie d'exposition et chimioprophylaxie. Ces limites d'efficacité sont renforcées en pratique par le coût des produits répulsifs et par les contraintes d'utilisation, expliquant le faible taux de bonne observance de la prophylaxie d'exposition. ■

SUMMARY What about exposure prophylaxis :

Malaria would not exist without mosquito bites. The growing resistance to antimalarial drugs has led to an increasing role of personal protection measures. However, insect repellents are not evaluated as medicinal products, and many products available on the market contain active substances that have been poorly evaluated or present in insufficient doses. The efficacy of the most active insect repellents, DEET and icardin/KBR 3023, like that of medicinal products, is limited by the subject's compliance, bearing in mind that the *Anopheles* bite is painless and that humans are primarily bothered by the nuisance factor of the mosquito.

Rev Prat 2005 ; 55 : 841-48

PALUDISME OÙ EN EST LA PROPHYLAXIE D'EXPOSITION ?

RÉSUMÉ Paludisme : où en est la prophylaxie d'exposition ?

Sans piqûre de moustique, il n'y pas de paludisme. L'augmentation des résistances aux médicaments antipaludiques redonne une place prépondérante aux moyens de protection personnelle. Mais les répulsifs ne sont pas évalués comme des médicaments, et de nombreux produits disponibles contiennent des principes actifs peu évalués, ou sous-dosés. Quant aux produits les plus actifs, DEET et Icaridine/KBR 3023, leur limite est, comme pour un médicament, la bonne observance, sachant que la piqûre de l'anophèle est indolore et que l'homme est d'abord sensible à la nuisance.

RÉFÉRENCES

1. Buescher MD, Rutledge LC, Wirtz RA. Effects of permethrine and DEET on bloodsucking arthropods. *Pestic Sci* 1987; 21: 165-73.
2. Roberts DR, Andre RG. Insecticide resistance issues in vector-borne disease control. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50 (Suppl.): 21-34.
3. Chareonviriyaphap T, Roberts DR, Andre RG *et al.* Pesticide avoidance behavior in *Anopheles albimanus*. *J Am Mosq Contr Assoc* 1997; 13: 171-83.
4. Chareonviriyaphap T, Sungvornyothin, Ratanathanam S *et al.* Insecticide-induced behavioral responses of *Anopheles minimus*. *J Am Mosq Contr Assoc* 2001; 17 : 13-22.
5. Rowland M, Downey G, Rab Abdur *et al.* DEET mosquito repellent provides personal protection against malaria: a household randomized trial in an Afghan refugee camp in Pakistan. *Tropical Medicine and International Health* 2004; 9: 335-42.
6. Kawada H, Maekawa Y, Tsuda Y *et al.* Trial of metofluthrin paper strip. *J Am Mosq Control Assoc* 2004; 20: 434-7.
7. Gilbert IH. Mosquito repellents. *JAMA* 1966; 196: 163-5.
8. Schreck CE. Techniques for the evaluation of insect repellents: a critical review. *Ann Rev Entomol* 1977; 22: 101-19.
9. Frances SP, Eikarat N, Sripongsai B *et al.* Response of *Anopheles dirus* and *Aedes albopictus* to repellents in the laboratory. *J Am Mosq Control Assoc* 1993; 9 (4): 474-6.
10. Fradin MS, Day JF. Comparative Efficacy of insect repellents against mosquito bites. *N Engl J Med* 2002; 347 (1): 13-18.
11. Trigg JK. Evaluation of a eucalyptus-based repellent against *Anopheles* spp. In Tanzania. *J Am Mosq Control Assoc* 1996; 12: 243-6.
12. Trongtokit Y, Curtis C. Efficacy of repellent products against caged and free flying *Anopheles stephensi* mosquitoes. Rapport de la London School of Hygiene and Tropical Medicine pour MASTA 2003.
13. Thavara U, Tawatsin A, Chompoosri J. Repellency of IR3535 and DEET. *J Am Mosq Control Assoc* 2001; 17: 190-5.
14. Costantini C, Badolo A, Ilboudo-Sanogo E. Field evaluation of the efficacy and persistence of insect repellents DEET, IR3535, and KBR 3023 against *Anopheles gambiae* complex and other Afrotropical vector mosquitoes. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 2004; 98: 644-52.
15. Insect repellents. The Medical Letter on drugs and therapeutics 2003; 45: 41-2.
16. Insect repellents. The Medical Letter on drugs and therapeutics 1989; 31: 45-7.
17. Klun JA, Khrimian A, Margaryan A *et al.* Synthesis and repellent efficacy of a new chiral piperidin analog: comparison with DEET and Bayrepel activity in human-volunteer laboratory assays against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *J Med Entomol* 2003; 40 (3) 293-9.
18. Frances SP, Nguyen Van Dun, Beebe NW *et al.* Repellents against rainforest mosquitoes. *J Med Entomol* 2002; 39 (3) 541-4.
19. Frances SP, Cooper RD. Personal protection measures against mosquitoes. *ADF Health* 2002; 3 (2): 58-63.
20. Kotwal RS, Wenzel RB, Sterling RA *et al.* An outbreak of malaria in US Army Rangers returning from Afghanistan. *JAMA* 2005; 293 (6): 678.
21. Govore J. Repellent effect on *An. arabiensis*. *Medical and Veterinary Entomology* 2001; 15: 287-92.
22. Maibach HI, Khan AA, Akers W. Use of insect repellents for maximum efficacy. *Arch Dermatol* 1974; 1009 : 32-5.
23. Frances SP, Waterson DGE, Beebe NW *et al.* Mosquito repellents in Australia. *J Med Entomol* 2004; 41 (3): 414-417.
24. Koren G, Matsui D, Bailey B. DEET based insect repellents: safety implications for children and pregnant and lactating women. *Jamc* 2003; 169 (3): 209-12.
25. Veltri J C, Osimitz T G, Bradford D C *et al.* Retrospective analysis of calls to Poison Control Centers resulting from exposure to the insect repellent DEET from 1985-1989. *Clin Toxicol* 1994; 32 (1): 1-16.
26. Mc Gready R, Hamilton KA, Simpson JA *et al.* Safety of the insect repellent DEET in pregnancy. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 285-9.
27. <http://www.cdc.gov/travel/bugs.htm>
28. Lambreg SI, Mulrennan JA. Bullous reaction to DEET. *Arch Dermatol* 1969; 100: 582-86.
29. Reuveni HR, Yagupsky P. DEET-containing insect repellent, adverse effects in worldwide use. *Arch Dermatol* 1982; 118: 582-3.
30. Montemarano AD, Gupta RK, Burge JR *et al.* Insect repellents and the efficacy of sunscreens. *Lancet* 1997; 349: 1670-1.
31. <http://www.hc-sc.gc.ca/pmra-arla>
32. Combemale P. La prescription des répulsifs. *Med Trop* 2001; 61: 99-103.
33. Menon KS, Brown AE. Exposure of children to DEET and other topically applied insect repellents. *Am J Ind Med* 2005; 47 (1): 91-7.
34. Bardelay D. Mieux prescrire les répulsifs pour se protéger des piqûres d'arthropodes. *Rev Prescr* 1994; (14) 141: 347-56.
35. Soto J, Medina F, Dember N *et al.* Efficacy of permethrin-impregnated uniforms in the prevention of malaria and leishmaniosis in colombian soldiers. *Clin Inf Dis* 1995; 21: 599-602.
36. Deparis X, Frere B, Lamizana M *et al.* Efficacy of permethrin-treated uniforms in combination with DEET topical repellents for protection of French military troops in Côte d'Ivoire. *J Med Entomol* 2004; 41 (5): 914-21.
37. Taplin D, Meinking TL. Pyrethrins and pyrethroids in dermatology. *Arch Dermatol* 1990; 126: 213-21.
38. Judge MR, Kobza-Black A. Crusted scabies in pregnancy. *Br J Dermatol* 1995; 132: 116-9.
39. Young D. Safety and efficacy of DEET and permethrin in the prevention of arthropod attack. *Military Med* 1998; 163 (5): 324-30.
40. Takken W. Do insecticide-treated bednets have an effect on malaria vectors? *Trop Med Int Health* 2002; 7 (12): 1022-30.
41. World Health Organisation 1997. Vector control: methods for use by individuals and communities; 388 pp.
42. Zaim M, Aitio A, Nakashima N. Safety of pyrethroid-treated mosquito nets. *Med Vet Entomol* 2000; 14 : 1-5.
43. Chandre F, Darriet F, Manguin S *et al.* Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc* 1999; 15 : 53-9.
44. Darriet F, Guillet P, N'Guessan R *et al.* Impact of resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets. *Med Trop* 1998; 58 (4): 349-54.
45. Corbel V, Chandre F, Brengues C *et al.* Dosage-dependent effects of permethrin-treated nets on the behaviour of *Anopheles gambiae* and the selection of pyrethroid resistance. *Malar J* 2004; 3 (1): 22-30.
46. Corbel V, Darriet F, Chandre F *et al.* Insecticide mixtures for mosquito net impregnation against malaria vectors. *Parasite* 2002; 9: 255-9.
47. Corbel V, Chandre F, Darriet F *et al.* Synergism between permethrin and propoxur against *Culex quinquefasciatus* mosquito larvae. *Med Vet Entomol* 2003; 17: 158-64.
48. Hougaard JM, Corbel V, N'Guessan R *et al.* Efficacy of mosquito nets treated with insecticide mixtures or mosaics against insecticide resistant *Anopheles gambiae* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Côte d'Ivoire. *Bull Entomol Res* 2003; 93 (6): 491-8.
49. Pennetier C, Corbel V, Hougaard JM. Combining a non-pyrethroid insecticide and a repellent: a new approach for controlling *Kdr* resistant mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 2005 (sous presse).

Eric Lundwall déclare avoir un lien direct avec les Laboratoires Osler - Insect Écran.

Annexe 9:

***Instructions et protocoles pour les bio-essais et évaluations en
cases expérimentales***

PROTOCOLE TEST EN TUBE OMS¹

1. Principe du test :

Le test en tube a pour but d'évaluer et de suivre sur des moustiques adultes le niveau de sensibilité à un insecticide (mesure de la résistance). Ce type de test permet également de comparer l'efficacité de différents insecticides vis à vis d'une espèce donnée ou inversement la sensibilité de plusieurs espèces de moustiques vis à vis d'un insecticide donné. Les résultats s'expriment en pourcentage de mortalité après 24 heures et, s'il s'agit d'un pyréthrinoïde, en terme de mortalité et d'effet Knock Down (effet KD). Il permet également de déterminer la dose diagnostique nécessaire pour l'évaluation de la résistance des moustiques sur le terrain.

2. Matériel :

- Tubes d'observation "vert" ;
- Tubes d'exposition "rouge" ;
- Deux (2) bagues métalliques par tube (argentée et dorée) ;
- Tiroirs ;
- Un (1) bouchon avec grille par tube ;
- Un (1) aspirateur à bouche ;
- Fiche de test « tube ».



3. Préparation du test :

Préparation des tubes de mise en observation "tube vert" :

- Préparer quatre tubes par concentration plus les témoins ;
- Mettre une feuille de papier filtre neutre dans les tubes, maintenue par deux bagues argentées ;
- Fermer avec un bouchon l'une des extrémités ;
- Mettre en place le tiroir à l'autre extrémité ;
- Prélever les moustiques directement dans la cage au moyen d'un aspirateur à bouche ;
- Faire des lots de 25 femelles et les glisser délicatement dans les tubes OMS ;
- Fermer le tiroir du tube vert et les mettre pendant 1 heure dans une étuve dont la température est comprise entre 26°C et 28°C et l'humidité relative entre 80 et 100 % ;
- Remplacer si besoin les moustiques morts.



¹ D'après "Série de Rapports Techniques N°443 OMS (17^{ème} rapport GENEVE 1970)".

Préparation des tubes d'exposition "rouges" :

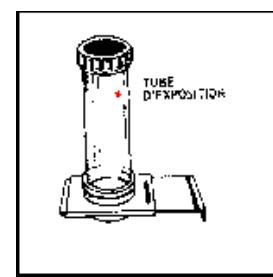
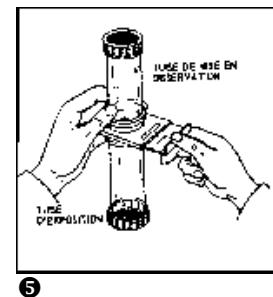
PREPARER SUR UNE PAILLASSE DESTINEE AUX MANIPULATIONS D'INSECTICIDE

Utiliser des gants à usage unique

- Placer les feuilles de papier imprégnées d'insecticide dans les tubes rouges, face imprégnée à l'intérieur (données lisibles à travers le tube),
- Faire tenir le papier avec 2 bagues dorées, puis fermer le tube avec un bouchon.

4. Déroulement du test :

- Préparer la fiche "test en tube" ;
- Visser le tube d'exposition sur le tiroir du tube d'observation ;
- Faire coulisser la plaque de manière à dégager entièrement l'ouverture (photo 5) ;
- Souffler doucement pour faire passer les moustiques du tube d'observation vers le tube d'exposition (photo 5bis) ;
- Fermer le tiroir en repoussant la plaque ;
- Détacher le tube d'observation et le placer derrière le tube d'exposition ;
- Laisser les tubes d'exposition en position verticale, tamis en haut pendant "1 heure" sous un éclairage diffus modéré (photo 6) ;
- Noter si besoin le nombre de moustiques KD à intervalles réguliers ;
- À la fin de la période d'exposition, faire passer les moustiques dans les tubes d'observation de la même manière que précédemment ;
- Conserver les tubes d'observation en position verticale pendant 24 heures dans une étuve sans lumière, entre 26 et 28°C et 80 à 100 % d'humidité (photo 7) ;
- Après 24 heures, compter le nombre de moustiques morts.



5. Critères d'acceptation :

Pour que le test soit validé la mortalité dans les tubes témoins doit être inférieur à 20 %, si celle-ci est comprise entre 5 et 20 % la mortalité des traités est corrigée selon la formule d'Abbott (1971).

PROTOCOLE TEST EN TUNNEL

1. Principe du test :

Le test en tunnel a pour but d'évaluer l'impact des moustiquaires imprégnées d'insecticides sur des moustiques adultes dans des conditions de laboratoire simulant les conditions du terrain (cases africaines par exemple). Les moustiques sont regroupés dans huit catégories :

1. gorgés - vivants - petit compartiment ;
2. gorgés - vivants - grand compartiment ;
3. gorgés - morts - petit compartiment ;
4. gorgés - morts - grand compartiment ;
5. non gorgés - vivants - petit compartiment ;
6. non gorgés - vivants - grand compartiment ;
7. non gorgés - morts - petit compartiment ;
8. non gorgés - morts - grand compartiment.

Selon qu'ils sont :

1. gorgés ou non-gorgés ;
2. vivants ou morts ;
3. d'un coté ou de l'autre de la moustiquaire imprégnée.

L'analyse détaillée de ces données permet de noter :

- la mortalité due à l'insecticide par détermination des moustiques morts (gorgés ou non gorgés, d'un coté ou de l'autre de la (paroi) moustiquaire) ;
- le degré de protection individuelle (PI) par détermination du nombre de moustiques gorgés (vivants ou morts, d'un coté ou l'autre de la paroi moustiquaire) ;
- le degré de protection collective (PC) par détermination du nombre de moustiques gorgés vivants d'un coté ou de l'autre de la (paroi) moustiquaire.

Dans une moindre mesure, ces huit catégories de moustiques peuvent donner une indication sur le degré minimum d'irritabilité/répulsivité de l'insecticide par détermination du nombre de moustiques récoltés à l'extérieur de la (paroi) moustiquaire.

Le test en tunnel utilisé par le LIN est inspiré du modèle mis au point par Elissa et Curtis². Il a été ensuite adapté par le LIN pour reproduire un peu plus des conditions naturelles puis validé en Côte d'Ivoire en comparant les résultats obtenus en parallèle dans le dispositif en tunnel et les cases expérimentales³.

2. Matériel :

- Un tunnel en verre rectangulaire en verre de 25 cm par 25 cm de section et de 60 cm de longueur ;
- Un cadre en carton plume de 25 cm par 25 cm ;
- Deux armatures métalliques cubiques ;
- Deux tulles moustiquaires tubulaires ;
- Moustiques femelles nullipares âgées de 5 à 7 jours.

² Elissa N. and Curtis C.F., 1995. Evaluation of different formulations of deltamethrin in comparison with permethrin for impregnation for netting. *Pesticide Science*, 44: 363-367.

³ Chandre F., Darriet F., Duchon S., Finot L., Manguin S. and Guillet P., 1999. Modifications of pyrethroid effects induced by kdr mutation in *Anopheles gambiae* s.s. *Medical and Veterinary Entomology*, 14,81-88.

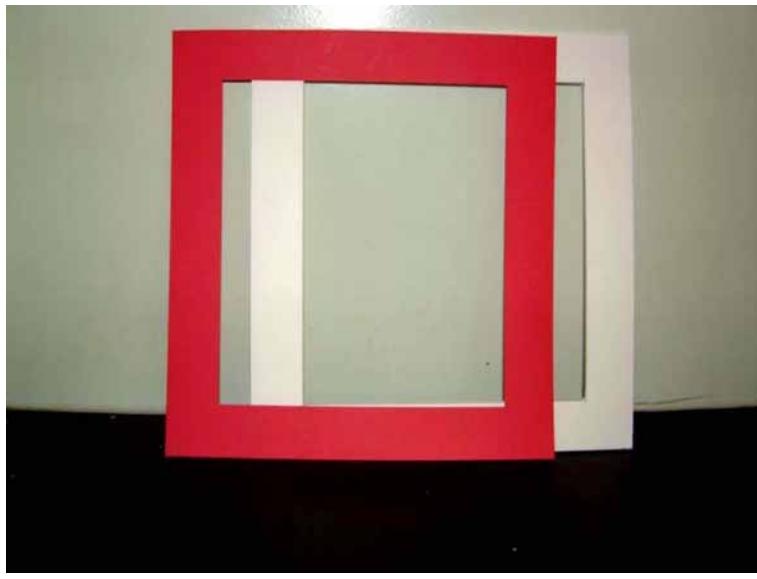
3. Préparation du test :

Le tunnel est divisé en deux compartiments séparés au deuxième tiers de sa longueur par des rails en aluminium. Une fente sur la partie supérieure du tunnel permet de glisser le cadre en carton plume.

Préparer un cadre en carton plume dont les dimensions extérieures correspondent à celle des rails du tunnel qui recevra ce cadre.

Découper l'intérieur aux dimensions voulues pour la manipulation (généralement 20x20 cm).

Découper le sur-cadre aux même dimensions que le cadre en carton plume. **Photo 1**



Placer le tulle moustiquaire imprégné d'insecticide et percé de 9 trous à tester entre le carton plume et le sur-cadre. **Photo 2** Fixer l'échantillon à tester en l'agrafant avec les deux cadres.

Photo 2

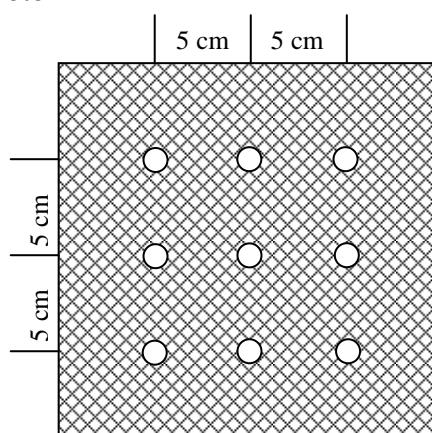


Photo 1

Fermer les bords avec du ruban adhésif afin de leur permettre s'insérer dans les rails.

Préparer dans des gobelets fermés par un tulle moustiquaire cent femelles de moustiques âgées de 5 à 7 jours, n'ayant jamais pris de repas de sang par tunnel.

Monter les tulles moustiquaires à chaque extrémité du tunnel. Les maintenir en place au moyen d'élastique.

Glisser les armatures métalliques dans les voiles. (voir photo ci contre)

Mettre en place le cadre en carton plume contenant la moustiquaire dans le tunnel.



4. Déroulement du test :

Le test se déroulant pendant la nuit, le lancement doit donc se faire à partir de 17h00.

Disposer le cobaye maintenu en contention dans une cage grillagée dans le petit compartiment.

Introduire les moustiques dans le grand compartiment.

Après une nuit (18h00-9h00) passée dans un environnement chaud et humide ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et 80 à 100 % d'humidité), les femelles sont prélevées dans les deux compartiments et classées selon les huit catégories décrites précédemment.



Protocole expérimental:

Pour un insecticide et une concentration donnés, on utilise simultanément trois appareils, deux appareils dotés d'une moustiquaire traitée à la concentration préconisée et un appareil doté d'une moustiquaire non traitée (témoin). Les différents paramètres d'évaluation selon les huit catégories énumérées précédemment s'expriment en pourcentage corrigé selon la loi des probabilités indépendantes (formule dite d'Abbott).

5. Critères d'acceptation :

Pour que le test soit validé, il faut que la mortalité chez les témoins soit inférieure à 20%, et leur taux de gorgement supérieur à 45%.

APPLICATION TOPIQUE

1. Principe du test :

Les applications topiques sont des tests qui visent à mettre en contact forcé l'insecte avec l'insecticide pour permettre de déterminer la relation dose-mortalité d'un insecticide sur des moustiques adultes. Il est pratiqué communément chez des insectes de grande taille (glossines, punaises, etc.) et a été récemment adapté par le LIN pour être utilisé sur des moustiques adultes.

Ce test fournit une mesure précise de l'activité par contact d'un insecticide, en dehors de tout autre effet lié au comportement de l'insecte face à l'agression insecticide. Ce phénomène est particulièrement vrai dans le cas des pyréthrinoïdes qui ont un effets irritant et répulsif.

Les résultats s'expriment en pourcentage de mortalité après 24 heures d'observation. Les résultats sont corrigés selon la loi des probabilités indépendantes (formule dite d'Abbott). L'analyse Log-Probit des données permet d'établir une droite de régression et de calculer les DL 50 et 95.

La matière active d'insecticide est dissoute dans de l'acétone, un solvant organique très volatil qui ne reste pas longtemps en contact avec la cuticule de l'insecte. Les concentrations d'insecticides s'expriment en nanogramme de matière active par mg de moustiques (ng/mg de moustique), ce qui impose au préalable la pesée des moustiques testés, le poids moyen est réalisé à partir d'une pesée globale de 50 moustiques.

2. Matériel :

- Une plaque réfrigérée ;
- Deux bacs en plastique ;
- Des pipettes pasteur en verre préparées avec un micro-capillaire ;
- Plume fine d'oiseau montée sur manche en plastique ;
- Petite coupelle de pesée ;
- Moustiques femelles à jeun, âgées de 3 à 5 jours ;
- Fiche de test « application topique ».



3. Préparation du test :

- Coller une feuille de papier sur le fond intérieur du bac plastique 1 ;
- Dans le bac plastique 2 mettre de la glace pilée sur les ¾ de la hauteur (s'il n'y a pas de machine à glace préparer la veille de l'eau dans le bac et le stocker à -20°C), tasser la glace ;
- Ajouter de l'eau sur 5 mm ;
- Mettre le bac 1 sur la glace ;
- Aspirer des moustiques dans une cage "roubeau" ;
- Anesthésier les moustiques au CO₂ (20 à 40 secondes de jet, 30 secondes en attente) dans une boîte plastique hermétique ;
- Repartir les moustiques endormis sur le fond du bac ;
- Séparer les mâles des femelles, faire des lots de 25 femelles.

Le micro-capillaire calibré de 0,1 µl permet de déposer une micro-goutte d'insecticide sur la face dorsale du pronotum de femelles de moustiques pris isolément et maintenus en léthargie grâce à une table réfrigérante maintenue à environ 4°C.

4. Déroulement du test :

IMPORTANT : toujours commencer par les témoins, puis continuer avec l'insecticide en dose croissante.

Déposer une série de 25 moustiques sur la table réfrigérante.



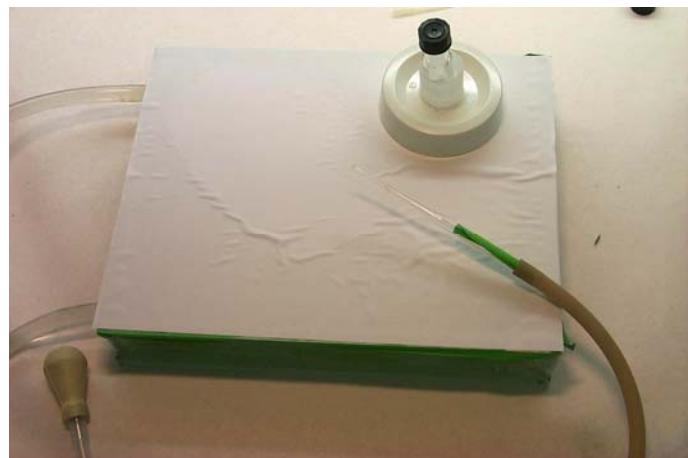
À l'aide du micro-capillaire, déposer 0,1 µl d'insecticide sur le dessus du thorax du moustique (pronotum).



Répéter l'opération pour les 25 moustiques. Transférer ceux-ci dans un gobelet plastique de 200 ml recouvert d'un tulle moustiquaire sur lequel est déposé un coton imbibé de jus sucré.

Recommencer ces opérations autant de fois que nécessaire pour avoir le nombre de moustique voulu pour chaque concentration d'insecticide.

Peser 50 moustiques pour obtenir le poids moyen d'un moustique.



À la fin du test placer les gobelets en observation pendant 24 heures dans l'obscurité dans une étuve dont la température est maintenue entre 26 et 28°C et l'humidité relative est comprise entre 80 et 100%.

Après ce temps, les moustiques morts sont décomptés.

5. Critères d'acceptation :

Pour que le test soit validé la mortalité chez les témoins doit être inférieur à 20 %, si la mortalité est comprise entre 5 et 20 % la mortalité des traités est corrigée selon la formule d'Abbott donnée page 3. De plus il faut obligatoirement obtenir quatre points exploitables pour l'analyse de la relation dose/effet (logiciel log/probit Analisys) pour que le test soit retenu.

TEST D'IRRITABILITE

1. Principe du test :

Le test d'irritabilité a pour but d'étudier le comportement d'un moustique vis à vis d'un insecticide à effet irritant (en général un pyréthrinoïde). Les tests d'irritabilité sont généralement effectués avec du papier Whatman pour éviter une pénétration trop importante de la matière active dans le substrat.

2. Matériel :

- Cônes standards en PVC fournis par l'OMS ;
- Papier Whatman imprégné avec l'insecticide à tester (voir référence sur la fiche instruction "Préparation des papiers imprégnés" page 8) ;
- Moustiques femelles à jeun, âgées de 3 à 5 jours.



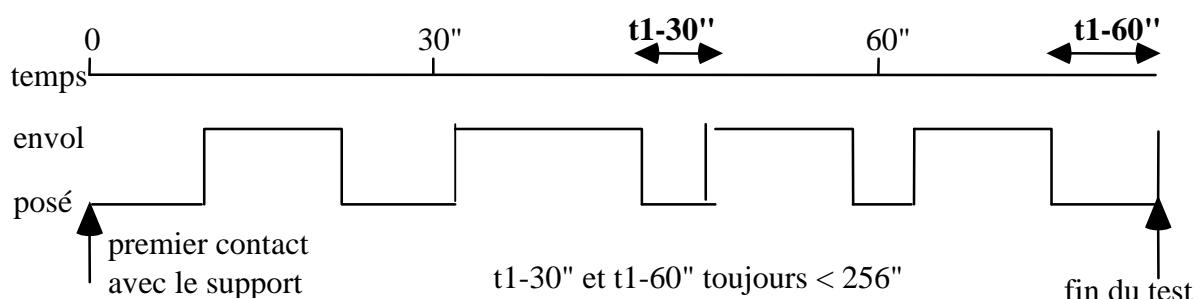
3. Déroulement du test :

Le calcul des temps d'envol se fait au moyen d'un programme informatique sous Excel conçu par le LIN. Lancer celui-ci.

Introduire un moustique dans le cône posé sur le papier imprégné d'insecticide. La concentration retenue pour l'imprégnation correspond à deux fois la valeur de la dose diagnostique (dose opérationnelle) déterminée par les tests en tube.

Suivre les indications données par le programme.

Lorsque le programme indique la fin du test ôter le moustique et recommencer jusqu'à l'obtention du nombre de moustiques voulus.



EVALUATION EN CASES PIEGES (PHASE II)

1. Principe de l'évaluation

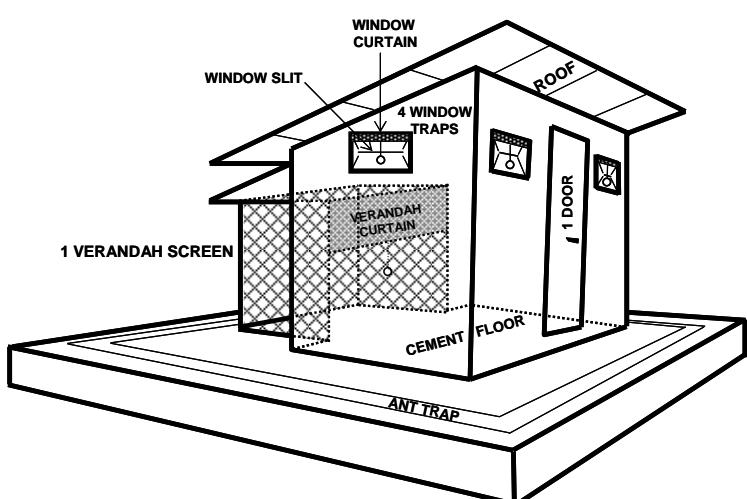
L'objectif de l'évaluation en phase II est de mesurer l'efficacité et la rémanence de moustiquaires imprégnées contre des populations naturelles d'anophèles vecteurs du paludisme. Ces évaluations sont réalisées au sein d'un réseau qui comporte 7 stations expérimentales dans des régions d'Afrique de l'Ouest et Centrale où les populations d'anophèles présentes des sensibilités différentes aux insecticides. Ainsi, il est ainsi possible d'évaluer l'efficacité des MII contre des moustiques porteurs de principaux les types des résistances (gène Kdr, Ace.1R, résistance enzymatique).

2. Description des cases et de l'évaluation

Les cases-pièges ont pour dimensions 3,50 mètres de longueur sur 2 mètres de largeur et 2 mètres de hauteur. Elles sont constituées d'une pièce d'habitation dont les murs sont en parpaings crépis de ciment, le sol en ciment, la charpente en bois et le toit en tôles ondulées. Une bâche en plastique est tendue en-dessous des tôles pour faciliter la capture des moustiques sur le plafond. Les matériaux employés sont habituellement utilisés pour la construction des maisons dans la région. Les maisons sont équipées de quatre ouvertures contrôlées (chicanes en bois) qui permettent l'entrée des moustiques dans la case, mais empêchent leur sortie, et d'une véranda-piège en moustiquaire rigide, l'équivalent d'une porte de sortie pour les moustiques (photo 1).



Pour mener une évaluation insecticide en phase 2 du protocole WHOPES, l'étude doit être agréée par le comité d'éthique des autorités nationales du pays (ministère de la santé). Chaque nuit, une personne s'installe dans une case-piège traitée ou non et y demeure de 20 heures à 5 heures. Lors de la première capture, les dormeurs sont tirés au sort pour leur emplacement dans les cases-pièges, puis procèdent à une permutation à chaque séance suivant un carré latin pour éviter l'attraction personnelle de chaque captureur d'influer sur les résultats. Les captures sont faites à partir de 5h30. Lors des captures, les moustiques sont récoltés individuellement dans des tubes puis identifiés et triés en différents lots (morts/vivants ; à jeun/gorgés) et étiquetés en fonction du lieu de la capture: à l'intérieur et à l'extérieur de la moustiquaire, sur les murs et le plafond de la case et dans la véranda-piège (tableau 1). Les après-midi qui précèdent les nuits de capture, chaque case-piège est soigneusement nettoyée pour éliminer les moustiques pouvant être présents ainsi que d'éventuels prédateurs (araignées, fourmis).



Dans les cases-pièges, quatre indicateurs entomologiques sont utilisés pour évaluer l'influence des insecticides (tableau 2) :

- effet dissuasif ou déterrent = réduction du taux d'entrée, obtenu en comparant les nombres de moustiques capturés dans les cases traitées et dans les cases témoins ;
- effet d'expulsion ou d'exophilie induite = augmentation du taux de sortie, obtenu en relevant le nombre de femelles récoltées dans les vérandas-pièges et dans les maisons elles-mêmes, ce qui permet de chiffrer l'exophilie naturelle (cases témoins) et l'exophilie induite par la présence d'un insecticide ;
- effet d'inhibition du gorgement = réduction du taux de gorgement, obtenu en comparant le nombre de femelles gorgées avec le total de spécimens capturés, ce qui permet d'évaluer leur taux de gorgement dans les cases témoins et celles traitées ;
- effet létal = augmentation du taux de mortalité. Les femelles récoltées mortes (mortalité immédiate) sont identifiées et comptées juste après leur capture. Les femelles prises vivantes sont mises en observation pendant 24 heures au laboratoire dans des gobelets en plastique pourvus d'un tampon d'eau miellée. Les moustiques morts en observation constituent la mortalité différée. La mortalité globale est obtenue par le cumul des mortalités immédiate et différée.

Tableau 1 : Fichier type de saisie quotidienne des données.

Immediate observations	Control	Control
------------------------	---------	---------

	Night n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	Date															
Veranda	N° Live	Unfed														
		Blood Fed														
	N° Dead	Unfed														
		Blood Fed														
Into Hut	N° Live	Unfed														
		Blood Fed														
	N° Dead	Unfed														
		Blood Fed														
Under Net	N° Live	Unfed														
		Blood Fed														
	N° Dead	Unfed														
		Blood Fed														

Additional mortality after 24 Hours

	Night n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	Date															
Veranda	N° Dead	Unfed														
		Blood Fed														
Into hut	N° Dead	Unfed														
		Blood Fed														
Under Net	N° Dead	Unfed														
		Blood Fed														

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des résultats sur la durée totale de l'évaluation.

<i>N</i>	females caught	Control	Treat1?	Treat1?	Treat2?	Treat3?	Treat4?	Treat5?
Deterrency	deterrency (%)	-						
Exophily	inside hut	0	0	0	0	0	0	0
	inside veranda	0	0	0	0	0	0	0
	inside net	0	0	0	0	0	0	0
	inside net (%)							
	exophily (%)							
	95% Conf. limits							
	<i>P</i>							
	induced exophily (%)	-						
	multiplied by	-						
Blood feeding	blood fed	0	0	0	0	0	0	0
	blood fed (%)							
	95% Conf. limits							
	<i>P</i>							
	blood feeding inhibition (%)	-						
	divided by	-						
	blood fed dead	0	0	0	0	0	0	0
	blood fed dead / blood fed (%)							
	blood fed dead /total (%)							
	<i>P</i>							
Mortality	overall mortality	0	0	0	0	0	0	0
	overall mortality (%)							
	95% Conf.limits							
	<i>P</i>							
	corrected for control (%)	-						
	95% Conf. limits	-						
	mortality unfed	0	0	0	0	0	0	0
	unfed dead / total dead (%)							
	unfed mortality / total (%)							
	<i>P</i>							
	corrected for control (%)	-						
	immediate mortality	0	0	0	0	0	0	0
	ratio immediate / total mortality (%)							
	immediate mort. / total (%)							
	<i>P</i>							
	corrected for control (%)	-						