

## Résumés en français

---

### RESUME COURT

Le projet DeltaSyn propose de développer une nouvelle stratégie de traitement adulticide contre les souches résistantes d'*Aedes aegypti* en associant la deltaméthrine à des molécules synergiques obtenues par modélisation QSAR afin de restaurer l'efficacité de ce pyréthrianoïde. Les différents tests *in vitro* et *in vivo* réalisés montrent que la molécule PSM-05 combinée au répulsif IR3535 permet d'atteindre cet objectif mais les proportions entre les deux molécules doivent encore être affinées.

### RESUME LONG

#### Contexte

Les maladies vectorielles transmises par les moustiques (Culicidés) sont en recrudescence. La lutte antivectorielle (LAV) au moyen d'insecticides ciblant les adultes reste un des seuls moyens de protéger les populations humaines et animales. Or, les changements de la réglementation européenne relative à la mise sur le marché des biocides ont réduit le nombre d'insecticides utilisables en santé publique. Ainsi, quasiment seuls les pyréthrianoïdes et, en particulier, la deltaméthrine sont actuellement autorisés en France comme adulticide. Or, en 2009, des résistances à la deltaméthrine ont été mises en évidence chez *Aedes aegypti* dans les Antilles françaises (Martinique, Guyane). Ces phénomènes réduisent de manière inquiétante l'efficacité des interventions de LAV alors que ces territoires font face régulièrement à des épidémies de dengue et de chikungunya de grande ampleur. Une gestion raisonnée de la résistance nécessitant une utilisation alternée de substances actives différentes est devenue un enjeu de santé publique majeur.

#### Objectifs

Le projet DeltaSyn a pour objectif de développer une nouvelle stratégie de traitement des moustiques adultes reposant sur l'utilisation de la deltaméthrine associée à des molécules connues afin d'obtenir des synergies d'actions. La combinaison d'une molécule synergique à la deltaméthrine est plus aisée et moins coûteuse à réaliser que la recherche d'une nouvelle substance active pour la remplacer. L'approche méthodologique et les résultats obtenus devraient être transposables au domaine de la protection phytosanitaire où la résistance inhérente à l'emploi des pyréthrianoïdes pose également un problème important.

#### Méthodologie

Les résultats de tests topiques sur femelles d'*Ae. aegypti* (DL<sub>50</sub> 24 h) obtenus selon le même protocole expérimental pour 74 molécules présentant des structures variées ont été utilisés pour élaborer des modèles QSAR. Les molécules ont été décrites par des indices topologiques et des descripteurs physico-chimiques. Différentes approches statistiques linéaires et non linéaires ont été utilisées pour construire les modèles. Les modèles ont été utilisés pour proposer des molécules candidates. La stratégie utilisée a consisté à rechercher des motifs structuraux spécifiques (« scaffolds ») dans des banques de données par études de similarité. Des molécules présentant des structures et activités prédites intéressantes ont été achetées pour être testées par le Partenaire 1. Les tests *in vivo* sur *Ae. aegypti* ont été réalisés sur la souche Bora-Bora, sensible aux familles connues d'insecticides et sur les souches résistantes issues des populations sauvages de La Trinité et de Vauclin en Martinique, mises en élevage chez le Partenaire 1 à partir d'œufs fournis par le Partenaire 3. L'activité intrinsèque de chaque molécule d'intérêt achetée a été évaluée au moyen d'un test par contact topique sur la souche Bora Bora pour démontrer leur faible toxicité et l'absence de propriétés insecticides. L'étape suivante, rajoutée au cours du projet et confiée au Partenaire 4, a consisté à mettre en évidence l'existence de propriétés synergiques des molécules d'intérêt au moyen d'une technique ratiométrique d'imagerie calcique *in vitro*. Le test est fondé sur le fait que l'élévation de la concentration en Ca intracellulaire est en lien avec l'augmentation de la sensibilité aux insecticides des cibles membranaires de neurones isolés des têtes de moustiques femelles adultes, issues des œufs transmis par le Partenaire 1. La synergie d'action a ensuite été explorée en conditions *in vivo* au moyen d'un test en tube par contact tarsal sur les souches Bora Bora et Vauclin, mais la difficulté de détection précise des

effets létaux a conduit à poursuivre cette évaluation avec les tests par contact topique. De multiples tests ont ensuite été réalisés pour réduire/ajuster les doses relatives des molécules d'intérêt en combinaisons binaires et ternaires avec la deltaméthrine. Enfin, l'évaluation *in silico* des effets écotoxicologiques et du comportement dans l'environnement de la molécule sélectionnée a été réalisée par le Partenaire 2.

### Principaux résultats obtenus

Un premier échantillon de 33 pipéridines a permis d'établir des modèles QSAR congénériques c'est-à-dire établis sur des séries structurellement homogènes de molécules. Ces modèles, outre leur intérêt intrinsèque, ont permis de déterminer le type de descripteurs et la méthode statistique à utiliser pour construire le modèle définitif, de type non congénérique à partir des 74 molécules. La description des molécules par la méthode d'autocorrélation modifiée et l'utilisation d'un réseau de neurones artificiels de type perceptron a permis de construire un modèle QSAR performant. Une recherche par similarité a conduit à l'achat de différentes molécules pour être testées par le Partenaire 1. Des tests topiques ont été réalisés sur la souche sensible Bora Bora pour évaluer les doses létales  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$ , exprimées en ng ou  $\mu\text{g}/\text{mg}$  p.v. femelle, de la deltaméthrine seule et de chaque molécule candidate prise séparément, ainsi que du PBO, DEET, de l'IR3535 et de la pipérine. Les résultats ont servi de points de référence pour les mélanges et permis de situer les résultats obtenus par rapport à la littérature ainsi que ceux utilisés pour élaborer le modèle QSAR définitif. Les tests *in vitro* ont apporté une preuve mécanistique qu'une des molécules candidates, le PSM-05 à  $10^{-10}\text{M}$ , présentait, en association avec la deltaméthrine à  $10^{-11}\text{M}$ , une synergie d'action sur les neurones isolés de la souche sensible Bora Bora mais pas sur ceux de la souche résistante Vauclin aux concentrations testées. Des difficultés d'ordre méthodologique et pratique ont conduit à abandonner ce test au profit des essais *in vivo*. Les tests par contact tarsal sur la souche sensible Bora Bora n'ont pas induit d'effets significatifs des mélanges deltaméthrine + PBO ou PSM-05 en termes de  $KT_{50}$  et  $KT_{90}$  exprimés en minutes par rapport à la deltaméthrine seule. Par contre, sur la souche résistante Vauclin, ces deux mélanges ont réduit par deux les  $KT$  obtenus avec la deltaméthrine seule traduisant un effet synergique. Délicats à interpréter, ces tests ont été délaissés au profit des tests topiques en utilisant le protocole proposé par Marcombe *et al.* (2009) ainsi qu' $1\ \mu\text{g}$  de PBO/femelle tel que proposé par ces auteurs et d'autres. Ainsi, sur la souche Bora Bora, l'application topique du mélange deltaméthrine + PSM-05 ( $1\ \mu\text{g}$ ) a confirmé les résultats du test par contact tarsal, à savoir l'absence d'effet supplémentaire comparativement à la deltaméthrine seule. Le PSM-05 a ensuite été comparé au PBO sur les souches résistantes Vauclin ou Trinité. Associé à la deltaméthrine, le PSM-05 ou le PBO ( $1\ \mu\text{g}$ ) permettent de diviser par deux la résistance à la deltaméthrine seule. L'adjonction de  $1\ \mu\text{g}$  de diéthyl maléate à ces mélanges binaires diminue celle-ci par 4. Le mélange deltaméthrine + PSM-05 ( $0,5\ \mu\text{g}$ ) + IR3535 ( $0,5\ \mu\text{g}$ ) permet d'obtenir des  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$  plus intéressantes encore mais ce résultat ne provient que d'un réplica. D'autres tests ont été réalisés mais ont été jugés non conformes et doivent être poursuivis. Enfin, le profil environnemental du PSM-05 est semblable voire légèrement meilleur que celui du PBO mais ces simulations demanderaient à être confirmées par des mesures expérimentales.

### Sorties opérationnelles pour décideurs, applications éventuelles

Le modèle QSAR définitif est opérationnel et il pourrait être utilisé de nouveau pour trouver de nouvelles molécules candidates (les autres aussi mais leur domaine d'application est plus limité).

Le mélange synergique identifié pourrait être opérationnel à court terme pour une utilisation pratique en LAV. Son emploi potentiel dans le domaine de la protection phytosanitaire ne peut être envisagé qu'après la réalisation d'un nouveau programme de recherche.

### Recommandations

Le retour d'expérience associé à l'état de l'art des connaissances en matière d'utilisation de synergistes pour restaurer la toxicité de molécules utilisées en LAV nous incite à encourager d'autres travaux sur le sujet car cette méthodologie, outre son intérêt pratique, permet de

limiter, voire d'empêcher, l'utilisation de nouvelles molécules limitant ainsi l'apparition de nouveaux problèmes potentiels de santé publique et environnementaux.

Un travail méthodologique visant à améliorer les protocoles des tests serait aussi nécessaire.

**MOTS-CLÉS**

QSAR, *Aedes aegypti*, synergiste, résistance, souches résistantes, tests en laboratoire, imagerie calcique, pyréthriinoïdes, deltaméthrine.

## Summaries in English

---

### SHORT ABSTRACT

The DeltaSyn project aimed at developing a new treatment strategy against resistant strains of *Aedes aegypti* adults by combining deltamethrin with synergistic molecules obtained by QSAR modelling in order to restore the efficacy of this pyrethroid. Various *in vitro* and *in vivo* tests showed that the PSM-05 molecule combined with the repellent IR3535 allowed us to reach this goal but the proportions between the two molecules still have to be refined.

### LONG ABSTRACT

#### Context

Vector-borne diseases transmitted by mosquitoes (Culicidae) are increasing. Vector control using insecticides targeting adult mosquitoes represents the unique strategy for protecting human and animal populations. However, changes in the European regulation of biocides have reduced the number of available substances. Thus, only pyrethroids, especially, deltamethrin can be used in France as adulticide. However, in 2009, resistance to deltamethrin was detected in *Aedes aegypti* in the French Antilles (Martinique, French Guiana). This phenomenon reduces the efficacy of the vector control treatments while our oversea departments are very often faced with dengue and chikungunya outbreaks. Rational resistance management requiring an alternating use of different active substances becomes a major public health challenge.

#### Objectives

The DeltaSyn project aimed at developing a new treatment strategy for adult mosquitoes based on the use of deltamethrin mixed with synergists in order to overcome problems of resistance. Such a strategy is easier and less expensive than finding a new active substance. The methodological approach and the results obtained should be transferable to plant protection, where problem of resistance with pyrethroids is also a major threat.

#### Methodology

Results of topical tests on *Ae. aegypti* females (24 h LD<sub>50</sub>) obtained according to the same experimental protocol for 74 structurally diverse molecules were used to develop QSAR models. The molecules were described by topological indices and their physicochemical properties. Different linear and nonlinear statistical approaches were used to derive the models. The models were used to propose candidate molecules. The strategy consisted in the search of molecules in databases by similarity studies from scaffolds. A list of potential active molecules was purchased to be tested by Partner 1. *In vivo* tests were carried out by Partner 1 on the susceptible *Ae. aegypti* Bora-Bora strain and on resistant strains from La Trinité and Vauclin (Martinique) and reared by Partner 1 from eggs supplied by Partner 3. The intrinsic activity of the selected molecules was evaluated using a topical contact test on the Bora Bora strain to demonstrate their low toxicity and lack of insecticidal properties. The next step, added during the project, was to highlight the existence of synergistic properties of molecules of interest using a ratiometric *in vitro* calcium imaging technique (Partner 4). The test is based on the fact that the increase in intracellular Ca concentration is related to the increase in insecticide sensitivity of membrane targets isolated from adult female mosquito heads obtained from eggs transmitted by Partner 1. Synergistic action was then explored using an *in vivo* tarsal tube test on Bora Bora and Vauclin strains. However, the difficulty of accurately detect lethal effects led to further use topical contact tests. Multiple tests were then performed to reduce/adjust the relative doses of the molecules of interest in binary and ternary combinations with deltamethrin. Finally, the ecotoxicity and environmental fate of the selected molecule was assessed from *in silico* tools by Partner 2.

#### Main results

A first set of 33 piperidines was used to derive congeneric QSAR models. These models, in addition to their intrinsic interest, allowed us to select the most interesting descriptors and statistical method to compute the final non-congeneric QSAR model from the whole set of 74 molecules. Molecules were described by the modified autocorrelation method and a three-

layer perceptron neural network was used to derive the final QSAR model. Similarity analysis in databases from scaffolds and QSAR simulation allowed us to select and purchase different molecules for testing by Partner 1. Topical tests were performed on the sensitive Bora Bora strain to evaluate the lethal doses LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub>, expressed as ng or µg/mg bw female, of deltamethrin alone and each candidate molecule alone, as well as DEET, IR3535 and piperine. The results were used as reference points for the mixtures and allowed comparison with the literature as well as with the data used to derive the final QSAR model. *In vitro* tests provided mechanistic evidence that one of the candidate molecules, PSM-05 at 10<sup>-10</sup>M, in combination with deltamethrin at 10<sup>-11</sup>M showed a synergistic action on neurons isolated from the sensitive strain Bora Bora but not on those of the resistant strain Vauclin at the concentrations tested. Methodological and practical difficulties have led to replace this test by the *in vivo* tests. Tarsal contact tests on the Bora Bora strain did not induce significant effects on deltamethrin + PBO or PSM-05 in terms of KT<sub>50</sub> and KT<sub>90</sub> expressed in minutes compared to deltamethrin alone. However, on the resistant Vauclin strain, these two mixtures halved the KT obtained with deltamethrin alone, reflecting a synergistic effect. Because they were difficult to interpret, these tests were discarded in favor of topical tests using the protocol proposed by Marcombe *et al.* (2009) and 1 µg BOP/female also proposed by them and other authors. Thus, on the Bora Bora strain, the topical application of deltamethrin + PSM-05 (1 µg) confirmed the results of the tarsal contact test, i. e. no additional effect compared to deltamethrin alone. PSM-05 was then compared to PBO on the Vauclin or Trinité resistant strains. Combined with deltamethrin, PSM-05 or PBO (1 µg) halves resistance of the pyrethroïd. Addition of 1 µg of diethyl maleate to these binary mixtures reduces this by four. Deltamethrin + PSM-05 (0.5 µg) + IR3535 (0.5 µg) provided even more interesting LD<sub>50</sub> and LD<sub>90</sub> values but this result was only obtained from one replica. Other tests were performed but were found to be non-compliant and need to be continued. Finally, the environmental profile of the PSM-05 was shown to be equivalent or a little bit better than that of the PBO but this needs to be confirmed by experimental measurements.

### **Applications for public policies**

The final QSAR model is operational and could be used again to find new candidate molecules (the others QSAR models are also operational but their applicability domain is more limited). The synergistic mixture identified could be quickly operational for practical use in vector control. Its potential use in the field of plant protection can only be envisaged after a new research program.

### **Recommendations**

The feedback associated with the state of the art on the use of synergists to restore the toxicity of molecules used in LAV pinpoints the need to carry out further work on the subject because this methodology, in addition to its practical interest, limits or even prevents the use of new insecticides thus limiting the emergence of new potential public health and environmental problems. Methodological work to improve test protocols is also requested.

### **KEY WORDS**

QSAR, *Aedes aegypti*, synergist, resistance, resistant strains, laboratory tests, calcium imaging, pyrethroids, deltamethrin