



HAL
open science

Une exposition subchronique à une dose sublétale d'Imidaclopride peut-elle entraîner une modification des récepteurs nicotiniques chez la blatte *Periplaneta americana* ?

Alexandre Bantz

► To cite this version:

Alexandre Bantz. Une exposition subchronique à une dose sublétale d'Imidaclopride peut-elle entraîner une modification des récepteurs nicotiniques chez la blatte *Periplaneta americana* ?. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2020. Français. NNT : 2020ANGE0017 . tel-03252444

HAL Id: tel-03252444

<https://theses.hal.science/tel-03252444v1>

Submitted on 7 Jun 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITÉ D'ANGERS

ÉCOLE DOCTORALE N° 600
École doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : « Biochimie, biologie moléculaire et cellulaire »

Par

Alexandre Bantz

**Une exposition subchronique à une dose sub létale
d'Imidaclopride peut-elle entraîner une modification des
récepteurs nicotiques chez la blatte *Periplaneta americana* ?**

Thèse présentée et soutenue à « l'Université d'Angers », le « 09 Décembre 2020 »

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

Rapporteurs avant soutenance :

Mme Catherine Armengaud
Maîtresse de conférences,
Université Paul Sabatier Toulouse III

M. Cédric Alaux
Chargé de recherche,
INRAE, Avignon

Composition du Jury :

Directrice de thèse

Mme Valérie Raymond
Professeure des Universités,
Université d'Angers

Co-encadrante de thèse

Mme Delphine Goven
Maîtresse de conférences,
Université d'Angers

Examineurs

M. Yannick Outreman
Professeur des Universités,
AgroCampus Ouest, Rennes

M. David Giron
Directeur de recherche,
CNRS, Tours

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



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

Consulter la licence creative commons complète en français :

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



A ma famille, petite par la taille,
mais grande par l'esprit.

Cette thèse a été réalisée au laboratoire Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et Récepteurs UPRES EA 2647 | USC INRAE 1330, SFR 4207 QUASAV de l'Université d'Angers et a été financée par l'INRAE et la région Pays de la Loire. Je remercie donc ces deux entités pour la chance qui m'a été donnée de réaliser mon projet thèse et surtout à Angers, la ville où il fait bon vivre. En premier, je voulais remercier les membres du jury, qui ont accepté la revision de cette thèse : Mme Armengaud qui m'a donné cours le Jeudi 26 Novembre 2015 sur « l'Écotoxicologie de la perception et de la mémoire chez l'abeille » de 10h30 à 12h30, abordant les effets sublétaux des produits phytosanitaires sur les abeilles dans le cadre du Master EPET. M. Outreman qui par son calme et son assurance a su nous rassurer le jour de la rentrée des « nouveaux doctorants » ainsi que pendant les Journées Scientifiques de l'ED EGAAL, Mr Cedric Alaux que j'ai cru apercevoir lors de mon séjour à Avignon, mais avec qui je n'ai pu discuter, j'espère pouvoir arranger cela par ces travaux de thèse, et enfin Mr Giron qui semble être une personne passionnée par la recherche et l'enseignement, j'ai hâte de pouvoir échanger avec vous ! (étant à moitié d'origine tourangelle je suis sûr que tout se passera bien).

Il serait sûrement trop long et délicat de citer toutes les personnes qui ont participé à ma formation scientifique et à mon épanouissement personnel. En premiers lieux je voulais remercier David Siaussat, qui m'a accepté en juillet 2014 et qui m'a accompagné dans ma thèse en tant que membre de mon CSI (n'oublions pas Jean-Philippe David dont les connaissances en détoxification ont orienté, à juste titre, mes travaux de recherche !). Laurence Besseau et Laura Gabriela Nisenbaum, qui ont été mes premières encadrantes en stage de M1, et qui m'ont donné l'envie de continuer dans la recherche (Elodie Magnagnou m'a fait persévérer !). Tu avais raison Laura, la thèse c'est le pire, mais aussi le meilleur moment de la vie ! Patricia Cucchi et Jehan-Hervé Lignot, qui m'ont encadré en stage de M2 à l'Université de Montpellier 2, au sein de l'Unité MARBEC, et à qui j'ai fait subir de terribles sessions de correction de rapport (imaginez une thèse...). Je voudrais avoir une pensée pour tous mes collègues de Master, Aurélien (le meilleur parmi les meilleurs), Apolline (la 3^{ème} meilleure après Aurel et moi ;)), Thibaut (Co-inventeur du Ricarboglace), Pierre (pour ces histoires toujours plus incroyables que les précédentes), Leïla (mon acolyte de révision, toujours au top), Laetitia (ma partenaire de fond de classe), et tous les autres qui ont eu le « bonheur » de me supporter pendant 2 ans... Merci à vous, d'ailleurs si vous me posez la question « C'est une bonne situation, ça, doctorant ? », je répondrai sans hésiter : « Mais, vous savez, moi je ne crois pas qu'il y ait de bonne ou de mauvaise situation. Moi, si je devais résumer ma vie de doctorant, aujourd'hui avec vous, je dirais que c'est d'abord des rencontres, des gens qui m'ont tendu la main, peut-être à un moment où je ne pouvais pas, où j'étais seul chez moi à organiser un rétroplanning. Et c'est assez curieux de se dire que les hasards, les rencontres, les expérimentations forgent une destinée... Parce que quand on a le goût de la chose, quand on a le goût de la chose bien faite, le beau geste, parfois on ne trouve pas l'interlocuteur en face, je dirais, le miroir qui vous aide à manipuler. Alors ce n'est pas mon cas, comme je le disais là, puisque moi au contraire, j'ai pu être encadré de la meilleure des façons ; et je dis merci à la vie, merci aux blattes, je leur dis merci, je chante la toxico, je danse la toxico... Je ne suis qu'amour ! Et finalement, quand beaucoup de gens aujourd'hui me disent : « Mais comment fais-tu pour avoir ces résultats ? », eh bien je leur réponds très simplement, je leur dis que c'est ce goût de l'amour des sciences, ce goût donc qui m'a poussé aujourd'hui à entreprendre une thèse de recherche, mais demain, qui sait, peut-être simplement à me mettre au service de la communauté scientifique, sous la forme d'un postdoc, et faire le don, le don de soi. (Modifié d'après tirade d'Otis dans Astérix et Obélix : Mission Cléopâtre, Chabat et al, 2001)

Je voulais aussi remercier tous les Angevins et doctorants qui m'ont incroyablement bien accueilli à mon arrivée. Il m'a fallu à peine 6 mois pour me sentir « angevins », je parle de Karim, Simon, Antoine, Martin, Timothée, Willfried, Alexandre, Stéphane, Javier, Céline, Laure, Nono, Francky, Yohan et tous les autres avec qui j'ai pu partager des moments agréables (Attention : ne buvez jamais d'eau nantaise !).

REMERCIEMENTS

Ces remerciements n'auront pas lieu d'être si je ne remerciais pas les personnes qui m'ont aidé et surement enduré pendant ces 3 ans. Jérémy, Véronique, Sébastien, Xavier, Éléonore, Marine, Julie, Josy, Luzia, Caroline et Véronique, merci à vous toutes et tous ! De plus, j'espère sincèrement que cette thèse sera extrêmement bien référencée dans tout moteur de recherche afin que mon message puisse être retrouvé par tous les élèves, stagiaires ou doctorants prochainement encadrés par Mr Bruno Lapied, Professeur à l'Université d'Angers : demandez-lui de faire sa fameuse charlotte aux fraises à la crème entière, et s'il est tendu, essayez de le relaxer avec les musiques du dessin animé : « Les Aristochats », c'est ma manière à moi de te remercier Bruno.

Je voudrais avoir une pensée pour 2 enseignants qui m'ont marqué. Le premier, Matthieu Dacher, qui nous a enseigné l'art des statistiques appliquées à la biologie, extrêmement utiles dans la compréhension de résultats, mais surtout dans le questionnement scientifique qui en découle. Son enthousiasme, sa passion et son enseignement resteront, pour longtemps, dans ma mémoire. J'espère de tout cœur que plusieurs générations d'élèves pourront profiter de ces talents d'enseignant. Le deuxième enseignant est Thomas Chertemps. Il m'a eu comme « bébé » L1 ou L2 (ça date un peu) pour l'un de mes premiers cours en biologie cellulaire. Redouté par certain, ou très apprécié par d'autre, il savait trouver les mots justes pour nous matraquer ses connaissances scientifiques avec son approche pédagogique, comment dire... singulière ! Je l'ai ensuite eu comme enseignant en Master. Ces premiers mots ? « Écoutez les loulous, c'est fini la licence, aujourd'hui je ne vous demande pas d'apprendre par cœur, mais juste de réfléchir avec vos petites têtes. Mon rôle à moi est de faire en sorte de vous former pour que vous soyez, un jour, des collègues avec qui je pourrais/voudrais travailler ». Ces mots, plein d'espoir (enfin je crois), font sens aujourd'hui, car j'ai eu la chance de travailler en collaboration avec Thomas au cours de ces travaux de thèse. Il a été d'une aide précieuse quant à la compréhension et l'analyse des résultats du séquençage ARN, et heureusement il reste encore plein de choses à faire avec ! J'espère sincèrement pouvoir continuer à travailler avec toi dans le futur, tu as fortement participé à mon éducation scientifique, et je t'en remercie infiniment.

Enfin, je n'oublierais jamais les personnes qui m'ont fait confiance pour mener à bien ce projet de recherche. Elles ont eu le courage (ou la folie) de recruter un jeune diplômé allant de petit boulot en petit boulot, sur un sujet dont il n'avait aucune connaissance au départ, et qui avait perdu espoir dans la réalisation de son projet professionnel. On dit souvent que derrière tout grand homme il se cache une femme. Or, j'ai eu l'incroyable privilège d'avoir deux encadrantes qui m'ont soutenu et épaulé dans les moments de doutes ou d'angoisses. On entend beaucoup trop souvent les mésaventures de doctorant avec leur encadrement, et il me paraît important de contredire cette image. Leur accompagnement, leur gentillesse, leur bienveillance et leur implication sans failles ainsi que leurs capacités d'écoute furent réellement le phare qui m'a guidé dans cette grande aventure. Que cela soit par leurs qualités scientifiques, mais aussi leurs qualités humaines, elles resteront, pour très longtemps, des personnes qui ont réellement compté pour moi. J'espère avoir été à la hauteur de leurs enseignements et suis très heureux d'avoir fait (un peu) partie de leurs carrières scientifiques. Sachez, Delphine Goven et Valérie Raymond, que vous avez toujours eu raison ! En espérant vous tutoyer un jour !

Fanny, je ne t'oublie pas, je sais que le temps a été long avant de voir le bout du tunnel et je te suis éternellement reconnaissant pour ta patience et le soutien que tu m'as apporté pendant ces 3 années !

Fluctuat nec mergitur

Table des matières

Liste des abréviations	8
Avant-propos	15
Partie 1 : Introduction	18
Chapitre 1 : Le système cholinergique et les récepteurs nicotiniques d'insectes.....	18
1. Généralités sur le système cholinergique.....	18
2. Découverte des récepteurs nicotiniques.....	19
3. Structure des récepteurs nicotiniques.....	20
4. Diversité des sous-unités nicotiniques chez les insectes.....	26
5. Pharmacologie des récepteurs nicotiniques d'insectes.....	32
6. Facteurs modulant les propriétés pharmacologiques des nAChRs.....	38
6.1. Modifications des propriétés pharmacologiques en fonction de la combinaison en sous-unités des nAChRs.....	38
6.1.1. Caractérisation de la pharmacologie des nAChRs en fonction de la combinaison en sous-unités chez la drosophile <i>Drosophila melanogaster</i>	38
6.1.2. Caractérisation de la pharmacologie des nAChRs en fonction de la combinaison en sous-unités chez le puceron vert du pêcher <i>Myzus persicae</i>	40
6.1.3. Caractérisation de la pharmacologie des nAChRs en fonction de la combinaison en sous-unités chez la cicadelle brune <i>Nilaparvata lugens</i>	41
6.1.4. Caractérisation de la pharmacologie des nAChRs en fonction de la combinaison en sous-unités chez la blatte <i>Periplaneta americana</i>	43
6.2. Mécanismes de régulation des récepteurs nicotiniques.....	44
6.2.1. Modulation allostérique.....	44
6.2.2. Régulation des récepteurs nicotiniques par les protéines auxiliaires.....	47
6.2.3. Régulation des récepteurs nicotiniques par les voies de signalisation intracellulaire.....	48
a) Étude de la régulation des récepteurs de sous-type nAChR1.....	49
b) Étude de la régulation des récepteurs de sous-type nAChR2.....	51
7. Localisation et rôle des récepteurs nicotiniques dans la physiologie des insectes.....	53
7.1. Les nAChRs synaptiques.....	54
7.2. Les nAChRs pré- et extra-synaptiques.....	55
7.3. Rôle physiologique des nAChRs.....	56
7.3.1. Rôles des nAChRs dans les fonctions cognitives.....	56
7.3.2. Rôles des nAChRs dans la locomotion.....	56
7.3.3. Rôles des nAChRs dans le sommeil et le rythme circadien.....	57
7.3.4. Rôles des nAChRs dans la reproduction.....	58
Chapitre 2 : Les insecticides ciblant les récepteurs nicotiniques.....	59

1.	Généralités	59
2.	Les différentes familles d'insecticides	60
2.1.	La nicotine	60
2.2.	Les buténolides	61
2.3.	Les mésoioniques : Triflumézopyrime	61
2.4.	Les sulfoximines : exemple du Sulfoxaflure	63
2.5.	Les néonicotinoïdes	64
2.5.1.	Historique et structures chimiques des néonicotinoïdes	64
a)	Historique	64
b)	Structures chimiques des néonicotinoïdes	65
2.5.2.	Données économiques et réglementation	68
2.5.3.	Cas particulier de l'Imidaclopride	70
a)	Propriété physico-chimique	70
b)	Toxicologie	71
c)	Site de fixation	72
Chapitre 3 : Effet des insecticides sur la physiologie des insectes		74
1.	Mécanismes de résistance	74
1.1.	Comportement d'évitement	74
1.2.	Épaississement de la cuticule	76
1.3.	Résistance métabolique	76
1.4.	Modification des cibles aux insecticides par des mutations ponctuelles	79
2.	Doses sublétales et phénomènes d'accommodation	80
2.1.	Persistance et devenir de l'Imidaclopride dans l'environnement	80
2.2.	Mécanismes d'accommodation	81
2.2.1.	Modification de la physiologie générale des insectes par une exposition à une dose sublétale d'insecticide	82
2.2.2.	Modifications cellulaires et moléculaires induites par une exposition des insectes à une dose sublétale d'insecticide	83
2.3.	Transmission des modifications cellulaires et physiologiques par des phénomènes épigénétiques	84
Chapitre 4 : Objectifs		85
Partie 2 : Matériels et méthodes		86
1.	Modèle biologique : la blatte <i>Periplaneta americana</i>	86
1.1.	Position phylogénétique	86
1.2.	Cycle de vie de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	87
1.3.	Élevage	88
1.4.	Avantages du modèle	88

1.4.1.	Critères morphologiques	89
1.4.2.	Critères biochimiques	89
1.4.3.	Critères électrophysiologiques	90
2.	Évaluation <i>in vivo</i> de l'effet de l'Imidaclopride par des tests toxicologiques	90
2.1.	Évaluation des marqueurs toxicologiques DL ₁₀ , DL ₅₀ et DL ₉₀	91
2.2.	Étude de l'effet d'une exposition subchronique à une dose sublétales d'Imidaclopride sur la mortalité des blattes.....	91
2.2.1.	Protocole d'intoxication	91
2.2.2.	Évaluation de la mortalité	92
3.	Identification et quantification de l'expression des différentes sous-unités nicotiques	92
3.1.	Dissection du dernier ganglion abdominal des blattes	92
3.2.	Extraction des ARN totaux	92
3.3.	Transcription inverse et traitement à la RNase H	93
3.4.	Identification des différentes sous-unités nicotiques exprimées dans le DGA de la blatte <i>P. americana</i>	93
3.4.1.	Amplification des cadres ouverts de lecture des sous-unités nicotiques par PCR	94
3.4.2.	Purification des produits de PCR.....	95
3.4.3.	Ligation des amplicons dans le vecteur de clonage pCR-Blunt	95
3.4.4.	Transformation bactérienne par choc thermique.....	95
3.4.5.	Criblage des colonies par PCR	96
3.4.6.	Purification et séquençage des plasmides recombinés	96
3.4.7.	Analyse des séquences et établissement d'un arbre phylogénétique	97
3.5.	Analyse par PCR quantitative de l'expression des sous-unités nicotiques en conditions physiologiques et après une exposition à une dose sublétales d'Imidaclopride.	97
4.	Évaluation de l'effet de la diminution de l'expression de sous-unités nicotiques sur la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride par la technique d'ARN interférence.	98
4.1.	Principe de la technologie d'ARN interférence	99
4.2.	Production des dsRNAs ciblant les sous-unités nicotiques $\alpha 2$ et $\beta 1$ de la blatte <i>P. americana</i>	99
4.2.1.	Identification des fragments nucléotidiques spécifiques des sous-unités nicotiques d'intérêt.....	99
4.2.2.	Amplification des fragments spécifiques par PCR et purification des amplicons	99
4.2.3.	Transcription <i>in vitro</i> et synthèse des dsRNAs	100
4.3.	Préparation des lipoplexes contenant les dsRNA et ingestion de dsRNA.....	101
4.4.	Validation des dsRNAs par PCR quantitative	101
4.5.	Évaluation de la modulation de la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride par des tests toxicologiques	102

5.	Analyses statistiques.....	102
6.	Impact d’une exposition subchronique à une dose sublétales d’Imidaclopride sur l’ensemble des transcrits du DGA de la blatte : analyse par séquençage du transcriptome à haut débit (RNAseq).....	102
6.1.	Échantillonnage et obtention des ARN totaux nécessaires à l’analyse de séquençage haut débit (RNAseq).....	102
6.2.	Séquençage	103
6.3.	Méthode d’analyse ad hoc.....	104
6.4.	Construction du transcriptome	106
6.5.	Approche sans <i>a priori</i>	107
6.6.	Approche orientée	108
	Partie 3 : Résultats	110
	Étude 1 : Modifications cellulaires et physiologiques induites par une exposition à des doses sublétales d’insecticide chez les insectes	111
	Étude 2 : Caractérisation des récepteurs ionotropes de la famille des « Cys-loop » chez la blatte <i>P. americana</i>	118
	Étude 3 : Analyse des modifications cellulaires et physiologiques induite par une exposition à une dose sublétales d’Imidaclopride chez la blatte <i>P. americana</i> : Rôle de la sous-unité nicotinique $\alpha 2$ dans la diminution de la sensibilité des blattes à l’Imidaclopride.	167
	Étude 4 : Utilisation des ARN interférents dirigés contre la sous-unité $\beta 1$ pour contourner les mécanismes d’acclimatation mis en place par la blatte <i>P. americana</i> suite à une exposition à une dose sublétales d’Imidaclopride	197
7.	Contexte et objectifs de l’étude	197
8.	Résultats	198
8.1.	Effet des dsRNAs sur l’expression des ARNm de la sous-unité $\beta 1$	198
8.2.	Évaluation de l’effet des dsRNAs- $\beta 1$ sur la sensibilité des blattes à l’Imidaclopride ..	199
9.	Conclusion.....	200
	Etude 5 : Analyse par RNAseq des modifications transcriptionnelles induites par l’exposition à une dose sublétales d’Imidaclopride chez la blatte <i>P. americana</i>	201
1.	Quantification des principaux acteurs en lien avec le système cholinergique.....	201
1.1.	Les sous-unités nicotiniques.....	201
1.2.	Protéines auxiliaires interagissant avec les sous-unités nicotiniques	203
1.3.	Protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire	204
1.4.	Protéines impliquées dans le fonctionnement des synapses.....	205
2.	Identification et quantification de l’ensemble des transcrits différentiellement exprimés suite au traitement à l’Imidaclopride des blattes.....	206
2.1.	Identification des gènes différentiellement exprimés après 30 jours de traitement à l’Imidaclopride	206
2.2.	Identification des gènes différentiellement exprimés 30 jours après l’arrêt du traitement à l’Imidaclopride.....	207

2.3. Identification des gènes pour lesquels la différence d'expression est maintenue 30 jours après l'arrêt du traitement à l'Imidaclopride.....	208
3. Conclusion	208
Partie 4 : Discussion	210
Conclusions et perspectives	215
Bibliographie.....	216
Table des illustrations	232
Table des tableaux	234

Liste des abréviations

-Divers-

[¹²⁵I]α-Bgt :	Alpha-Bungarotoxine radiomarquée à l'isotope 125 de l'Iode
[³H]Epi :	Epibatidine radiomarquée au tritium
[³H]Imi :	Imidaclopride radiomarquée au tritium
[³H]Met :	Méthylcarbamylocholine radiomarquée au tritium
[Ca²⁺]_{intra} :	Concentration en calcium intracellulaire
[Ca²⁺]_{extra} :	Concentration en calcium extracellulaire

-Chiffre-

1kb :	1 kilo base = 1000 nucléotides
5-HT :	5-hydroxytryptamine
5-HTCl_s :	Récepteurs canaux perméables aux ions chlorures et dépendants de la sérotonine
5-HTR :	Récepteur canal sensible à la sérotonine

-α-

α-CTX :	Alpha-Conotoxine
α-Bgt :	Alpha-Bungarotoxine

-δ-

δ-Tbc :	Delta-Tubocurarine
----------------	--------------------

-A-

Å :	Angstrom = 10 ⁻¹⁰ mètre
AA :	Acides aminés
AC :	Adénylate cyclase
ACh :	Acétylcholine
AChBP :	« Acetylcholine Binding Protein »
AChCl_s :	Récepteurs canaux perméables aux ions chlorures et dépendants de l'acétylcholine
AChE :	Acétylcholinestérase
ADAR :	Adénosine désaminase agissant sur l'ARN
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALS :	α-like subunit (Dα1)
Amel_α :	Sous-unité nicotinique α d' <i>Apis mellifera</i>
Amel_β :	Sous-unité nicotinique β d' <i>Apis mellifera</i>

AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
APV :	Acide phosphonopentanoïque
ARD :	« Acetylcholine receptor Drosophila » (Dβ1)
ARN :	Acide ribonucléique
ARNc :	Acide ribonucléique complémentaire
ARNi :	Acide ribonucléique interférent
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATP :	Adénosine triphosphate
-B-	
BAPTA :	Acide tétra-acétique 1,2-bis(o-aminophenoxy)éthane
BIPAA :	« BioInformatics Platform for Agroecosystem Arthropods »
Boα :	Sous-unité nicotinique α de <i>Bradysia odoriphaga</i>
Boβ :	Sous-unité nicotinique β de <i>Bradysia odoriphaga</i>
Btα :	Sous-unité nicotinique α de <i>Bombus terrestris</i>
Btβ :	Sous-unité nicotinique β de <i>Bombus terrestris</i>
-C-	
C≡N :	Groupement cyano
Ca²⁺ :	Ion calcium
Ca²⁺/Cal :	Complexation de la protéine calmoduline avec un ion calcium
CaCl₂ :	Chlorure de calcium
Cal :	Calmoduline
CamKII :	Protéine kinase Sérine/Thréonine dépendante du complexe Ca ²⁺ /Calmoduline
CbCh :	Carbamylcholine
CCVD :	Canal calcique voltage dépendant
CDP :	Condelfine
CE :	Carboxylestérases
CE₅₀ :	Concentration d'une molécule produisant 50% de l'effet maximal
Cf :	Caféine
CF₃ :	Trifluorométhyle
CI₅₀ :	Concentration d'une molécule inhibant 50% de la réponse maximale
CK2 :	Caséine kinase de type 2
CL₅₀ :	Concentration d'une molécule conduisant à 50% de létalité
Clo :	Clothianidine
CNQX :	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione

Ct :	« Cycle treshold » = Cycle seuil d'analyse d'expression de gène en qPCR
Cys-Loop :	Boucle cystéine
Cyt :	Cytisine
Cyt P450 :	Cytochrome P450

-D-

DAG :	Diacylglycérol
DCJW :	N-décarbométhoxyllaté JW062
DDT :	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DGA :	Dernier ganglion abdominal
DhbE :	Dihydro- β -érythroïdine
DiC8 :	1,2-dioctanoyl-sn-glycerol
DL₅₀ :	Dose d'une molécule conduisant à 50% de létalité
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
dNTP :	Désoxynucléotide triphosphate
Dop :	Dopamine
dsRNA :	« double stranded RNA » = ARN double brin
DUM :	« Dorsal unpaired median »
Dα :	Sous-unités nicotiques α de <i>Drosophila melanogaster</i>
Dβ :	Sous-unités nicotiques β de <i>Drosophila melanogaster</i>

-E-

<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
Epi :	Epibatidine

-F-

FPF :	Flupyradifurone
FPKM :	« Fragment per Kilobase Million »

-G-

GABA :	Acide γ -aminobutyrique
GABA_a :	Récepteur canal sensible à l'acide γ -aminobutyrique
GC :	Guanylate cyclase
GluCl_s :	Récepteurs canaux perméables aux ions chlorures et dépendants du glutamate
GluR :	Récepteur sensible au glutamate
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GST :	Glutathion S-transférase
GTP :	Guanosine triphosphate

-H-

HEPES :	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
Hex :	Héxaméthonium
HisCl_s :	Récepteurs canaux perméables aux ions chlorures et dépendants de l'histamine
HVA :	« High Voltage-Activated »

-I-

iEES :	Institut d'écologie et des sciences de l'environnement
I_{max} :	Amplitude maximale d'un courant
Imi :	Imidaclopride
I_{moy} :	Amplitude moyenne d'un courant
INERIS :	Institut national de l'environnement industriel et des risques
INPN :	Institut National du Patrimoine Naturel
INRS :	Institut national de recherche et de sécurité
IP3 :	Inositol triphosphate
IRAC :	« Insecticide Resistance Action Committee »

-K-

K⁺ :	Ion potassium
KCl :	Chlorure de potassium
K_D :	Constante de dissociation
KN-62 :	1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-méthyl-L-tyrosil]-4-phenylpiperazine
K_{oc} :	Coefficient de partage d'une molécule entre le carbone organique et l'eau
K_{ow} :	Coefficient de partage d'une molécule entre l'octanol et l'eau
KT :	KT5823 = (8R,9S,11S)-(-)-9-methoxy-carbamyl-8-méthyl-2,3,9,10-tetrahydro-8,11-époxy-1H,8H,11H-2,7b,11a-trizadibenzo-(a,g)-cyclo-octa-(c,d,e)-trin-den-1-one

-L-

LBD :	« Ligand binding domain »
LGIC :	« Ligand Gated Ion Channel »
LOE 908 :	(R,S)-(3,4-dihydro-6,7-diméthoxy-isoquinoline-1-yl)-2-phenyl-N,N-diacetamide
LVA :	« Low Voltage-Activated »
Lynx 1 :	Protéine Ly-6/neurotoxine 1
Lynx 2 :	Protéine Ly-6/neurotoxine 2

-M-

m/μ/nA :	Milli/micro/nano Ampère
m/μ/nM :	Milli/micro/nano Molaire
mAChRs :	Récepteurs muscariniques
MAFFT :	« Multiple Alignment using Fast Fourier Transform »
MAPKKK4 :	« Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 4 »
Mec :	Mécamylamine
MFO :	« Mixed Function Oxydase »
MgCl₂ :	Chlorure de magnésium
MgSO₄ :	Sulfate de magnésium
MLA :	Méthyllycaconitine
Mpα :	Sous-unité nicotinique α de <i>Myzus persicae</i>
Mpβ :	Sous-unité nicotinique β de <i>Myzus persicae</i>

-N-

Na⁺ :	Ion sodium
nAChD :	« Desensitized nicotinic acetylcholine receptor »
nAChN :	« Non desensitized nicotinic acetylcholine receptor »
NACHO :	« Novel nAChR regulator »
nAChR1 :	Récepteur nicotinique de type 1
nAChR2 :	Récepteur nicotinique de type 2
nAChRs :	Récepteurs nicotiniques
NAM :	« Negative Allosteric Modulator »
NCBI :	« National Center for Biotechnology Information »
NH₂ :	Amine
Nic :	Nicotine
NIα :	Sous-unité nicotinique α de <i>Nilaparvata lugens</i>
NIβ :	Sous-unités nicotiniques β de <i>Nilaparvata lugens</i>
nt :	Nucléotide

-O-

Oct :	Octopamine
--------------	------------

-P-

P2X :	Récepteur dépendant de l'ATP
PA :	Potentiel d'action
Paα :	Sous-unité nicotinique α de <i>Periplaneta americana</i>
Paβ :	Sous-unité nicotinique β de <i>Periplaneta americana</i>

PAM :	« Positive Allosteric Modulator »
PBO :	Pipéronyle butoxyde
PCR :	« Polymerase Chain Reaction »
PDE1A :	Phosphodiesterase spécifique de l'AMPc/GMPc et dépendante du complexe calcium/calmoduline
pH :	Potentiel hydrogène
pHCl :	Récepteur canal perméable aux ions chlorures et sensible au pH
PIP2 :	Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate
PKA :	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC 1/2 :	Protéine kinase C de type 1/2
PKG :	Protéine kinase dépendante du GMPc
PLC :	Phospholipase C
PMA :	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PP1/2A :	Protéine phosphatase de type 1/2A
PPSE :	Potentiel post-synaptique excitateur
PSH INRAe :	Laboratoire Plantes et Système de cultures Horticoles de l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement
PTX :	Picrotoxine
-R-	
RIC-3 :	« Resistance to inhibitors of cholinesterase »
RISC :	« RNA-induced silencing complex »
RNAseq :	Séquencage des ARN
RT-PCR :	« Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction »
RT-qPCR :	« Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction »
Rβ :	Sous-unité nicotinique β de <i>Rattus norvegicus</i>
Rγ :	Sous-unité nicotinique γ de <i>Rattus norvegicus</i>
Rδ :	Sous-unité nicotinique δ de <i>Rattus norvegicus</i>
-S-	
SAD :	« Second α -like subunit of Drosophila » (D α 2)
SAM :	« Silence Allosteric Modulator »
SETMAR :	Histone-lysine N-méthyltransferase composé du domaine catalytique SET et de la transposase Mariner
SFX :	Sulfoxaflore
siRNA :	« Small interfering ribonucleic acid »
Spi A :	Spinosyn A

-T-

t_{1/2} :	Temps de demi-vie d'une molécule
Taq :	ADN polymérase de <i>Thermus aquaticus</i>
Tg :	Thapsigargine
TM1/2/3/4 :	Domaine transmembranaire 1/2/3/4
TMP :	Triflumézopyrime
TMX3 :	Protéine transmembranaire liée à la thiorédoxine
TRP_γ :	« Transient Receptor Potential γ »

-U-

UICPA :	Union internationale de chimie pure et appliquée
UMP-CMP kinase :	Cytidylate kinase
UV :	Ultra-violet

-W-

W7 :	N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide
-------------	--

Avant-propos

L'agriculture contemporaine a pour mission de répondre au besoin alimentaire de la population. De par son rôle primordial dans notre société, elle se retrouve donc au centre des considérations politiques, écologiques et scientifiques. Il est donc important de rappeler brièvement le contexte actuel dans lequel s'inscrit cette thèse.

La démographie de la population humaine est un facteur important, car elle conditionne les prises de décision à court, moyen et long terme. En se basant sur l'évolution de la population au cours des derniers siècles et sur les projections pour les futures décennies, il est possible d'anticiper nos actions afin de répondre efficacement aux défis qui nous attendent. La population a continuellement augmenté depuis 2 millénaires. Néanmoins, ce rythme s'est drastiquement accéléré au milieu du 19^{ème} siècle grâce aux avancées scientifiques et technologiques. Les projections des Nations-Unies selon différents scénarios de fertilité et politiques sociales estiment une population mondiale variant entre 7,3 et 15,6 milliards d'individus à l'horizon 2100. De très récentes études estiment plus précisément que la population atteindra un pic en 2064 à 9,74 milliards d'individus, suivi d'un déclin jusqu'en 2100 avec 8,79 milliards d'individus (Vollset et al, 2020). Il est donc évident que la population mondiale sera en augmentation rapide pendant les 4 prochaines décennies. Ceci exacerbe un problème déjà existant à l'heure actuelle qui est la capacité qu'a l'agriculture à nourrir la population. À l'heure actuelle, il est estimé qu'entre 800 et 925 millions de personnes sont en souffrance alimentaire (Webb et al, 2018).

Afin de subvenir aux besoins alimentaires d'une population croissante, l'agriculture a dû faire face à de nombreux défis. La production de nourriture de qualité en quantité suffisante tout en conservant des rendements élevés à moindre coût est le plus important. Les avancées technologiques et scientifiques du 19^{ème} et du début du 20^{ème} siècle ont permis une intensification des récoltes avec une hausse des rendements. Ceci s'est avéré possible grâce à l'utilisation, entre autres, d'engrais chimiques. L'utilisation d'engrais a continuellement augmenté depuis le début des années 60. La consommation d'intrant est passée de 31,7 millions de tonnes (Mt) en 1961 à 192,7 Mt en 2017. La consommation d'engrais a été multipliée par 6,1 sur 56 ans, soit un taux de croissance moyen de +3,37% par an. À partir du milieu du 20^{ème} siècle, un nouvel élément a permis de soutenir l'augmentation des rendements agricoles *via* la protection des récoltes contre les ravageurs de culture par l'utilisation d'insecticides. Ces derniers sont répartis dans différentes familles selon la composition chimique de la molécule active. Les organochlorés, dont fait partie le DDT, ont été la première classe d'insecticide à être utilisée. Puis, d'autres classes d'insecticides ont été utilisées en agriculture au cours du temps telles que les organophosphates avec la mise sur le marché du Parathion en 1948 (IRAC, 2015), les carbamates avec le Carbaryl en 1956 (Thacker, 2002; Tiwari et al, 2018), les pyréthrinoïdes avec la Permethrine en 1972 (Pickett et Khambay, 2014) et les néonicotinoïdes avec l'Imidaclopride sous la formulation Gaucho en 1991 (Gervais et Stone, 2010; Bass et al, 2015). Or, des modifications environnementales importantes telles que la dégradation des habitats

naturels, la contamination des sols par des substances chimiques persistantes, une diminution de la biodiversité et l'apparition d'organismes résistants à des insecticides peuvent-être imputées, entre autres, à l'utilisation d'insecticides (Sánchez-Bayo et Wyckhuys, 2019). Ces impacts anthropiques sur l'environnement nous obligent aujourd'hui à revoir les pratiques agricoles utilisées afin de répondre efficacement aux problématiques économiques, environnementales et politiques futures.

En France, 63 692 tonnes de pesticides ont été utilisées à des fins agricoles en 2009 et 70 589 tonnes en 2017, soit une augmentation de 9,8% en 8 ans (Source FAOstat, consultée en Mars 2020). Or, cette augmentation entre 2009 et 2017 s'est faite dans un contexte politique et agricole particulier. L'objectif du plan Ecophyto 2018, adopté en septembre 2008, visant à réduire la consommation de pesticides de 50% entre 2008 et 2018 n'a pas été atteint. Un nouveau plan, Ecophyto II+, a alors été mis en place afin d'atteindre cet objectif d'ici l'horizon 2025. Cet engagement politique visant à réduire la dépendance de l'agriculture vis-à-vis des insecticides a permis le financement de nombreux programmes de recherches, dans lesquels s'inscrivent ces travaux de thèse financés par l'INRAe et la Région Pays de la Loire.

La problématique est donc que l'agriculture contemporaine doit faire face à un important défi qui est d'assurer une production de qualité capable de répondre à l'ensemble des besoins alimentaires d'une population mondiale en perpétuelle croissance tout en diminuant de 50% sa consommation de produits phytosanitaires. Cette problématique agricole s'insère dans un contexte écologique particulier où il a été observé une augmentation du nombre d'espèces d'insectes ravageurs de culture présentant des adaptations physiologiques, moléculaires et cellulaires leur conférant une résistance aux insecticides. Ceci implique donc la recherche de nouvelles stratégies de lutte. Depuis plus de 30 ans, la mise au point de ces stratégies et leur optimisation se concentrent, entre autres, sur des molécules ayant un effet insecticide. On retrouve parmi celles-ci des molécules neurotoxiques ciblant des récepteurs présents dans le système nerveux des insectes. Parmi ces cibles, les récepteurs nicotiques font l'objet de nombreuses recherches car ils sont d'une importance capitale dans la physiologie de l'insecte. Ceci est supporté par la découverte et l'utilisation importante des néonicotinoïdes depuis la mise sur le marché de l'Imidaclopride au début des années 1990, mais aussi par l'apparition récente de nouveaux insecticides tels que le Sulfoxaflure, le Triflumézopyrime et le Flupyradifurone ciblant les récepteurs nicotiques des insectes (Casida, 2018).

L'objectif de ces travaux de thèse est donc de comprendre quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires participant à la mise en place d'une adaptation aux insecticides chez les insectes. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'implication des récepteurs nicotiques dans la réponse adaptée de la blatte *Periplaneta americana* à une exposition subléthale d'Imidaclopride.

Pour cela, ce manuscrit s'articulera autour de 4 parties. La première partie sera divisée en 4 chapitres, dont le 1^{er} traitera le système cholinergique en général, sa caractérisation chez les

insectes, la pharmacologie associée aux récepteurs nicotiques, leurs différentes régulations ainsi que leurs rôles physiologiques chez les insectes. Puis, le 2^{ème} chapitre abordera les insecticides ciblant les récepteurs nicotiques, en particulier le néonicotinoïde Imidaclopride. Le 3^{ème} chapitre sera consacré aux effets des insecticides sur la physiologie des insectes, où nous détaillerons les différents mécanismes de résistance associés à cet insecticide et le concept de doses sublétales ainsi que les mécanismes d'accommodation mis en place chez les insectes exposés à ces doses. Les objectifs de ces travaux de thèse seront présentés dans le chapitre 4. La deuxième partie détaillera notre modèle biologique : la blatte *Periplaneta americana* ainsi que les différentes techniques et méthodes utilisées au cours de ces travaux de thèse. La troisième partie exposera les résultats obtenus qui seront ensuite discutés dans la quatrième partie. Enfin, ce manuscrit se terminera par une conclusion et les perspectives de recherche envisagées.

Partie 1 : Introduction

Chapitre 1 : Le système cholinergique et les récepteurs nicotiniques d'insectes

1. Généralités sur le système cholinergique

Le système cholinergique désigne l'ensemble des neurones du système nerveux central et périphérique capables de synthétiser et de sécréter un neurotransmetteur particulier : l'acétylcholine. L'acétylcholine (nom UICPA : 2-acétoxyéthyl-triméthylammonium) est une molécule dont la formule chimique brute est $C_7H_{16}NO_2$. Elle fut synthétisée pour la première fois en 1867 par Adolf Von Baeyer. Ce n'est qu'en 1914 que les propriétés biologiques de l'acétylcholine ont été mises en évidence à partir d'extrait d'ergot de seigle ayant un « effet d'inhibition sur le cœur » (Ewins, 1914). Les propriétés physiologiques de l'acétylcholine ont été étudiées en parallèle par Dale en 1914 (Dale, 1914). Il a pu mettre en évidence l'action vasodilatatrice de cette molécule conduisant à une diminution de la pression artérielle chez le chat (Dale, 1914). Enfin, l'origine neuronale de cette molécule fut découverte par Otto Loewi en 1921 (Loewi, 1921). Ce dernier démontra que la stimulation électrique du nerf vague, conduisant à une diminution du rythme cardiaque chez la grenouille, avait comme conséquence la libération dans le liquide de perfusion d'une substance qu'il nomma « substance vague » (« vagusstoff » en allemand). Puis, la perfusion d'un second cœur dénervé avec ce même liquide entraînait une réponse similaire à une stimulation du nerf vague. Henry Dale conclut qu'il existait alors un intermédiaire chimique entre la terminaison nerveuse du nerf vague et le cœur. Les travaux de Dale qui s'en sont suivis ont alors permis d'identifier l'acétylcholine comme étant le neurotransmetteur libéré à la jonction neuromusculaire des nerfs innervant les muscles striés (Dale et al, 1936). Les travaux sur l'acétylcholine de Dale et Loewi ont fait l'objet du prix Nobel de Médecine en 1936. Il est connu aujourd'hui que l'acétylcholine joue un rôle de neurotransmetteur dans le système nerveux central ainsi qu'au niveau des jonctions neuromusculaires chez les vertébrés (Fisher et Wonnacott, 2012). Il est à noter que l'acétylcholine est une molécule chimique retrouvée chez les bactéries, les champignons, les protozoaires et les plantes (Horiuchi et al, 2003). L'utilisation de l'acétylcholine par des organismes aussi éloignés évolutivement met en évidence l'importance physiologique de cette molécule dans le vivant.

2. Découverte des récepteurs nicotiniques

La découverte de l'acétylcholine en tant que neurotransmetteur induit l'existence d'un élément capable de recevoir le message cholinergique en aval de la terminaison nerveuse. En effet, le concept de « substance réceptrice » fut abordé par Langley en 1907 par l'application de nicotine directement sur le muscle dénervé de grenouille. Ces observations l'ont conduit à émettre l'hypothèse que « les différentes drogues n'avaient pas d'action spécifique sur la terminaison nerveuse motrice, mais que la plupart des fonctions attribuées à ces terminaisons nerveuses sont, en réalité, fonction de la substance réceptrice du muscle » (Langley, 1907). Cette hypothèse laisse donc déjà présager l'existence de récepteurs ayant des réponses spécifiques aux différentes drogues utilisées. Cette réponse serait alors modulée en fonction des récepteurs présents au niveau de la plaque motrice. Néanmoins, cette hypothèse n'a pu être validée qu'avec la caractérisation pharmacologique et moléculaire de ces récepteurs. La première étape dans l'identification de cette protéine réceptrice fut de la classer en fonction des réponses induites par différentes molécules. Les contractions musculaires induites par l'acétylcholine pouvaient être mimées par l'application de nicotine (Gasser et Dale, 1926) ou de muscarine (Ewins, 1914). Il a été mis en évidence que cette protéine réceptrice pouvait alors être de 2 types. L'inhibition de l'effet de la nicotine par l'addition de δ -tubocurarine a permis de caractériser une réponse de type nicotinique alors que l'inhibition de l'effet de la muscarine par l'addition d'atropine a permis de mettre en évidence une réponse de type muscarinique. Ceci a permis l'émergence du concept de récepteurs nicotiniques (nAChRs) et de récepteurs muscariniques (mAChRs). La caractérisation moléculaire des récepteurs nicotiniques a été réalisée sur des membranes purifiées d'électrocytes d'anguille électrique (*Electrophorus electricus*), qui est une source très riche en récepteurs nicotiniques. Il a été démontré que l'activation de ces récepteurs par des agonistes tels que la carbamylcholine produisait un flux d'ions Na^+ à travers cette membrane purifiée. Ce flux d'ions était alors bloqué par l'application d' α -bungarotoxine (α -Bgt), un antagoniste irréversible des nAChRs, ou de δ -tubocurarine (δ -Tbc), un antagoniste réversible de ces récepteurs (Changeux et al, 1970). L'utilisation d'agoniste et d'antagoniste dans l'étude de Changeux et de ses collaborateurs (Changeux et al, 1970) a permis de caractériser les récepteurs nicotiniques comme étant des récepteurs canaux perméables aux ions sodium. L'hypothèse de Dale supposant l'existence de récepteurs spécifiques est alors validée grâce aux variations de réponse observées en fonction des drogues utilisées (Changeux, 2020).

3. Structure des récepteurs nicotiniques

Dans les années 70, la structure moléculaire des récepteurs nicotiniques au niveau de la jonction neuromusculaire de la torpille électrique (*Torpedo marmorata*) s’est précisée (Cartaud et al, 1973; Reynolds et al, 1978; Lindstrom et al, 1979). La purification et le clonage des sous-unités nicotiniques α (Giraudat et Changeux, 1982; Sumikawa et al, 1982), β , δ (Noda et al, 1983) et γ (Ballivet et al, 1982) de torpille ont permis d’importants progrès dans l’étude des structures primaire, secondaire et tertiaire des nAChRs. L’étude de la structure protéique des sous-unités a conduit au classement des récepteurs nicotiniques dans la famille des récepteurs canaux dépendants de ligand (LGIC : « Ligand Gated Ion Channel »). Cette grande famille rassemble les récepteurs canaux membranaires composés de 3 à 5 sous-unités. La fixation d’un ligand provoque la modification de la conformation spatiale du récepteur par la légère rotation des sous-unités qui le composent. Cette rotation entraîne alors l’ouverture du canal ionique situé au centre du récepteur nicotinique. Le nombre de sous-unités qui forment les récepteurs LGIC permet de les classer selon 3 familles différentes (Changeux et Edelstein, 1998; Collingridge et al, 2009; Tovar et Westbrook, 2012) (Figure 1).

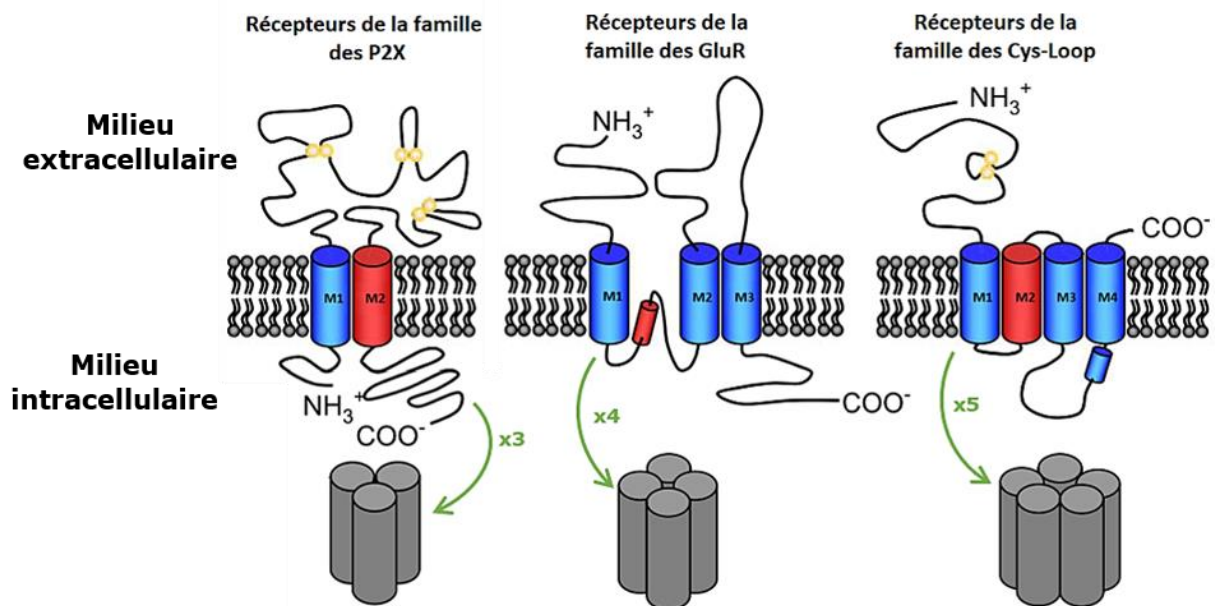


Figure 1. Représentation schématique des 3 différentes familles de récepteurs appartenant à la famille des LGIC. En vue transversale, les cylindres bleus sont les hélices α transmembranaires des sous-unités, en rouge les hélices α transmembranaires participant à la formation du canal ionique. En jaune sont représentées les cystéines participant à la formation d’une liaison disulfure. Modifiée d’après Tovar et Westbrook, 2012.

Les récepteurs canaux dépendants de l'ATP ou récepteurs de la famille des P2X forment des récepteurs trimériques dont chaque sous-unité possède 2 domaines transmembranaires reliés par une grande boucle extracellulaire. Les parties N- et C-terminales de ces sous-unités sont intracellulaires. Les récepteurs canaux cationiques dépendants du glutamate ou GluR sont des récepteurs tétramériques. Les 4 sous-unités formant ce récepteur possèdent 3 domaines transmembranaires dont la partie N-terminale est extracellulaire alors que la partie C-terminale est intracellulaire. Enfin, les récepteurs pentamériques dont chaque sous-unité est constituée de 4 domaines transmembranaires appartiennent à la famille des récepteurs « Cys-Loop ».

La famille des récepteurs « Cys-Loop » regroupe de nombreux récepteurs canaux dépendants de neurotransmetteurs tels que :

- les récepteurs canaux GABAergiques ($GABA_A$) et glycinergiques qui sont activés respectivement par l'acide γ -aminobutyrique et la glycine, ces deux types de récepteurs sont perméables aux ions chlorures.
- les récepteurs canaux perméables aux cations de type sérotoninergique (5-HTR) qui sont activés par la sérotonine.
- les récepteurs nicotiniques (nAChRs) activés par l'acétylcholine.

Chez les invertébrés, en plus des récepteurs décrits précédemment, il a été trouvé d'autres récepteurs de type LGIC appartenant eux aussi à la famille des « Cys-loop » (Raymond et Sattelle, 2002; Millar, 2006). Ceux-ci sont des récepteurs canaux perméables aux ions chlorures qui peuvent être dépendants de l'acétylcholine pour les AChCl (Kehoe et McIntosh, 1998), du glutamate pour les GluCl (Cleland, 1996; Kane et al, 2000; Smith et al, 2000), de l'histamine pour les HisCl (Gisselmann et al, 2002; Zheng et al, 2002) et de la sérotonine pour les 5-HTCl (Leßmann et Dietzel, 1995; Ranganathan et al, 2000). Ces récepteurs de la famille des « Cys-loop » partagent des caractéristiques communes. En effet, ils sont tous formés de 5 sous-unités agencées en pentamères. Les sous-unités possèdent une partie N-terminale extracellulaire comprenant 2 cystéines espacées de 13 acides aminés (Millar, 2006; Jones et Sattelle, 2010; Fisher et Wonnacott, 2012) (Figure 2A). Les groupements sulfhydryles (-SH) de ces cystéines vont former, en condition physiologique, un pont disulfure créant ainsi une boucle extracellulaire (Figure 2B). En plus d'être à l'origine du terme « Cys-loop » caractérisant les récepteurs appartenant à cette famille, cette boucle cystéine participe à l'assemblage des sous-unités du récepteur (Green et Wanamaker, 1997). Les sous-unités constituant le récepteur possèdent 4 domaines transmembranaires (M1 à M4) composés d'acides aminés hydrophobes formant 4 hélices α (Miyazawa et al, 2003). La boucle entre les domaines M1 et M2 ainsi que celle entre les domaines M3 et M4 sont intracellulaires. La boucle M3-M4, qui possède de nombreux sites de phosphorylation, peut être variable en séquence d'acides aminés et en longueur. La forme pentamérique de ces récepteurs aboutit à la formation d'un canal central dont les parois sont constituées des résidus du domaine M2 de chaque sous-unité. La longueur totale en acide aminé des sous-unités varie entre 430 et 630 acides aminés.

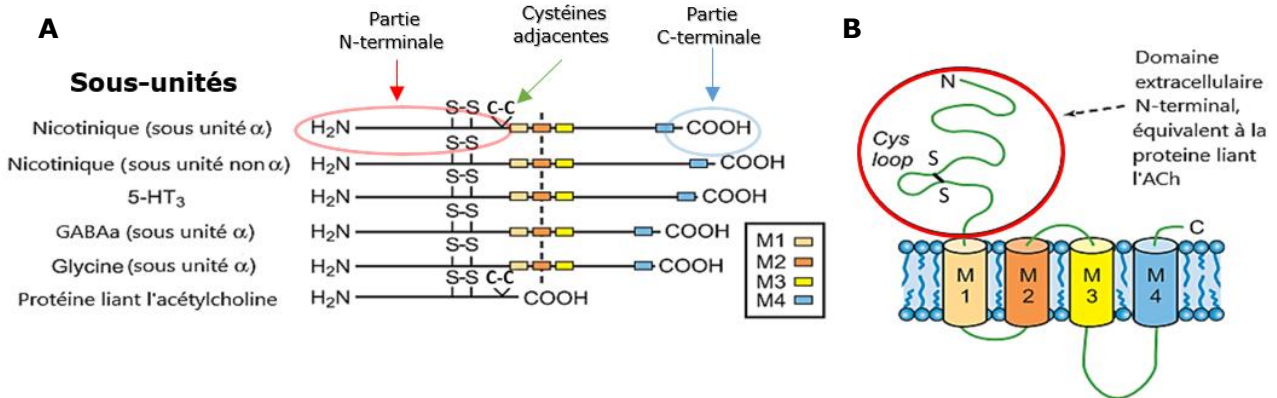


Figure 2. Représentations schématiques A) des différentes sous-unités des récepteurs « Cys-loop » ; on retrouve la partie N-terminale extracellulaire, la liaison disulfure des cystéines espacées de 13 acides aminés (S-S) formant la boucle cystéine ou « Cys-loop », les cystéines (C-C) adjacentes, les 4 domaines transmembranaires (M1 à M4) et une partie C-terminale extracellulaire et B) d'une sous-unité de récepteur « Cys-loop » insérée dans la membrane plasmique. Modifiées d'après Fisher et Wonnacott, 2012.

Les sous-unités nicotiniques α , appelées composantes principales, possèdent la particularité d'avoir 2 cystéines adjacentes dans la partie N-terminale extracellulaire. Les sous-unités nicotiniques où ces 2 cystéines adjacentes sont manquantes, sont considérées comme non α et appelées β , δ et γ/ϵ (Figure 2A). Les 2 sous-unités γ et ϵ se différencient par leur expression différentielle au cours du développement. Il a été montré chez le bœuf, que la sous-unité γ est principalement présente dans le muscle embryonnaire. Elle sera progressivement remplacée par la sous-unité ϵ lors du développement musculaire du veau (Mishina et al, 1986). Chez les vertébrés, les récepteurs nicotiniques musculaires sont constitués des sous-unités α_1 , β_1 , δ , γ/ϵ ayant pour stœchiométrie respective 2:1:1:1. Les récepteurs nicotiniques neuronaux sont uniquement constitués des sous-unités α et β , allant de α_2 à α_{10} et de β_1 à β_4 chez les vertébrés (Sargent, 1993; Le Novère et al, 2002) et peuvent être homopentamérique ou hétéropentamérique. Dans le premier cas, les 5 sous-unités composant le récepteur nicotinique sont toutes identiques entre elles. La formation de ces récepteurs a pu être observée pour les sous-unités nicotiniques telles que α_7 , α_8 , α_9 ou α_{10} (Couturier et al, 1990; Elgoyhen et al, 1994; Gotti et al, 1994). Dans le cas d'un récepteur hétéromérique, les 5 sous-unités nicotiniques formant le récepteur nicotinique pentamérique sont différentes. L'expression des sous-unités α_7 , α_8 , α_9 et α_{10} peuvent également participer à la formation d'un récepteur nicotinique hétéromérique, avec une préférence d'assemblage des sous-unités α_7 avec α_8 retrouvé dans la rétine de poulet (Keyser et al, 1993; Gotti et al, 1994) ou bien l'assemblage d' α_9 avec α_{10} (Le Novère et al, 2002). L'organisation hétéromérique des récepteurs nicotiniques fait intervenir des sous-unités α différentes entre elles ou bien un assemblage de sous-unités α et β . En effet, il a été montré que les récepteurs neuronaux s'assemblaient préférentiellement selon la stœchiométrie $2\alpha : 3\beta$, tel le récepteur nicotinique $2\alpha_4 : 3\beta_2$ (Anand et al, 1991; Galzi et Changeux, 1995; Dani, 2015). Néanmoins, il a aussi été observé des assemblages

hétéromériques favorisés entre les sous-unités α . L'étude de Conroy (Conroy et al, 1992) portant sur l'immunoprécipitation de la sous-unité $\alpha 5$ a permis de mettre en évidence un coassemblage de la sous-unité $\alpha 5$ avec $\alpha 3$ ou $\alpha 4$, voire, dans une moindre mesure, les 2 en même temps (Conroy et al, 1992). En prenant en compte le nombre de sous-unités nicotiques α et β , la conformation en pentamère, la forme homomérique ou hétéromérique ainsi que la stœchiométrie associée à cette dernière, il apparaît qu'il existe une très grande variété de récepteurs nicotiques neuronaux potentiels.

Les sous-unités nicotiques ont pu être décrites atomiquement jusqu'à une résolution de 4 Å par Unwin en 2005 (Unwin, 2005). Cette étude a permis d'obtenir des informations importantes sur la structure, la conformation spatiale et les interactions des sous-unités conduisant à la formation d'un récepteur nicotinique. La sous-unité nicotinique α de torpille décrite par Unwin est composée de 437 acides aminés (AA) et participe à la formation d'un récepteur nicotinique musculaire. La partie N-terminale commence par une hélice α ($\alpha 1$ helix) de 10 AA, suivie d'un feuillet β ($\beta 1$ sheet) de 15 AA. Ces deux structures sont séparées de 14 AA. La succession des feuillets β ($\beta 2$ à $\beta 10$) formera la partie extracellulaire de la sous-unité nicotinique participant à la fixation du ligand (« Ligand binding domain » ou LBD) (Figure 3A) (Brejc et al, 2001). Les 4 segments transmembranaires (M1 à M4) s'étendent sur une longueur de 240 AA environ, cette longueur peut varier en fonction de l'espèce considérée. L'inclusion de ces domaines transmembranaires dans la bicouche lipidique aura comme résultat la formation de boucles intra et extracellulaires. La plus grande boucle intracellulaire se situe entre les domaines M3 et M4 et est formée généralement par plus d'une centaine d'acides aminés. Sa séquence protéique varie en fonction de l'espèce et comporte de nombreux sites de phosphorylation potentiellement impliqués dans la régulation du récepteur nicotinique (Huganir et Greengardt, 1990; Galzi et Changeux, 1995; Raymond et al, 2017). La partie C-terminale extracellulaire est généralement courte, par exemple pour la sous-unité nicotinique α de torpille cette dernière mesure 2 AA. En termes de taille, les sous-unités forment un récepteur nicotinique de 160 Å de long et de 80 Å de diamètre (Figure 3B). Le canal ionique traversant la membrane est encadré par un vestibule cylindrique extracellulaire de 20 Å de diamètre et d'un vestibule conique intracellulaire formé par l'interaction des hélices α amphipathiques intracellulaires des sous-unités (Figure 3C). Ces hélices α amphiphiles forment des fenêtres d'environ 8 Å par lesquelles les cations solvatés peuvent passer. Le site de fixation du ligand se situe dans une poche hydrophobe située à environ 40 Å au-dessus de la membrane plasmique, à l'interface des sous-unités α/γ et α/β (Figures 3B et 3C).

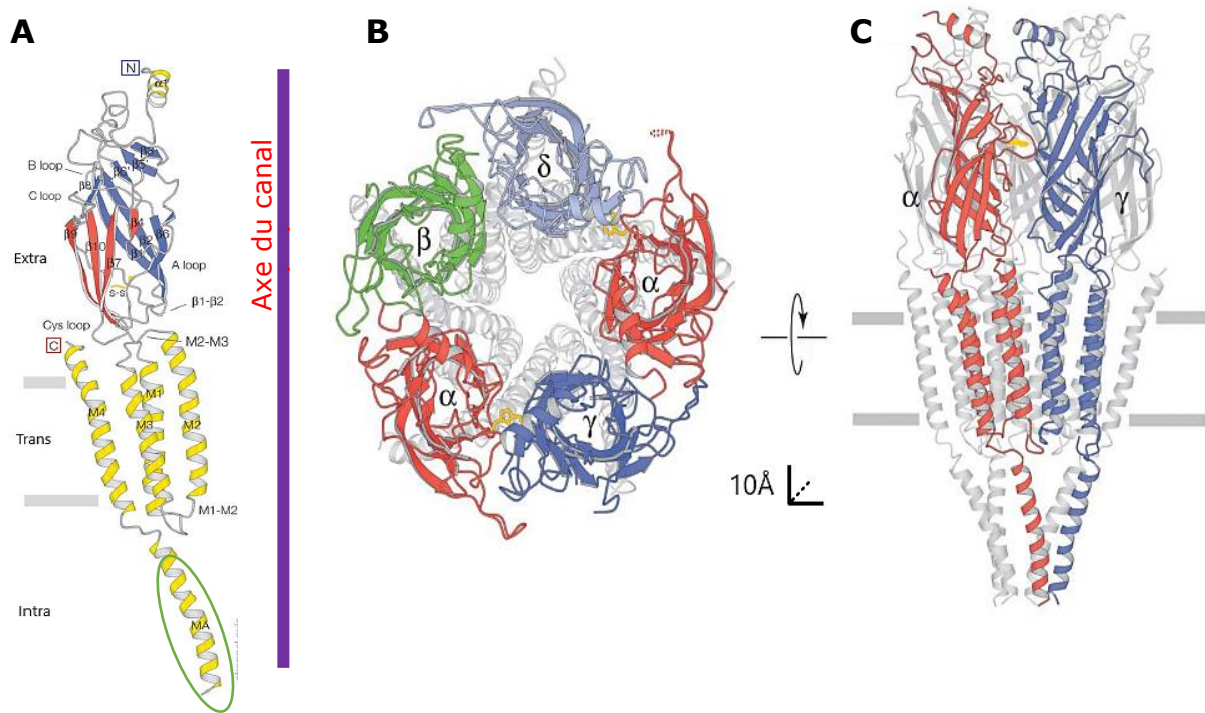


Figure 3. A) Vue de profil d'une sous-unité nicotinique modélisée avec l'axe du canal ionique sur sa droite, en violet. On retrouve avec le positionnement des feuillets β ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 5'$, $\beta 6$, $\beta 6'$, $\beta 8$ et $\beta 4$, $\beta 7$, $\beta 9$, $\beta 10$ en bleu et rouge respectivement) participant à la couche interne et externe de la partie N-terminale. En doré, est représenté le pont disulfure (S-S) formé par les cystéines créant ainsi la « Cys-loop ». Les structures en jaune sont des hélices α . Les hélices α M1, M2, M3 et M4 correspondent aux domaines transmembranaires décrits précédemment. L'hélice α entourée en vert possède des propriétés amphipathiques lui permettant de se positionner dans la partie intracellulaire. Récepteur nicotinique musculaire de la torpille *Torpedo marmorata* vu B) de dessus et C) à travers la membrane plasmique. On constate l'arrangement pentamérique des sous-unités en un récepteur respectant la stœchiométrie $2\alpha:1\beta:1\delta:1\gamma$. La position du site de fixation se situe au niveau du tryptophane 149, représenté en doré en B) et C). Modifiée d'après Unwin, 2005 et Unwin, 2013.

La structure du récepteur nicotinique décrite jusqu'alors est retrouvée chez d'autres espèces, aussi bien vertébrés qu'invertébrés (Marshall et al, 1990; Millar et Gotti, 2009; Sattelle, 2009; Jones et Sattelle, 2010). La caractérisation du domaine de fixation s'est faite par l'étude des structures tertiaires formées dans la partie extracellulaire N-terminale. Cette partie extracellulaire se retrouve être le seul élément du récepteur exposé au milieu externe et donc capable de fixer l'acétylcholine. Des expériences de photo-affinité permettant de cartographier les acides aminés impliqués dans la fixation d'un ligand ont permis de démontrer que la fixation du ligand se faisait au niveau de l'interface de 2 sous-unités adjacentes α ou d'une sous-unité α et d'une sous-unité non- α (Dennis et al, 1988; Galzi et al, 1991; Middleton et Cohen, 1991). Puis, grâce aux avancées dans le clonage des sous-unités nicotiniques, aux expériences de mutagenèses dirigées et à l'analyse des charges des acides aminés (Mishina et al, 1985; Kao et Karlin, 1986; Galzi et al, 1990; O'Leary et White, 1992; Czajkowski et al, 1993; Corringer et al, 1995; Prince et Sine, 1996; Martin et al, 1996; Matsuda et al, 2000; Shimomura et al, 2002), il est apparu l'existence de structures clés dans la partie N-terminale des sous-unités nicotiniques.

Ces régions ont été nommées boucles A, B, C pour les sous-unités α de la composante principale et boucles D, E, F pour les sous-unités α ou non- α (β , δ ou γ/ϵ) de la composante complémentaire, participant à la formation du site de fixation du ligand (Figure 4) (Le Novère et al, 1999; Itier et Bertrand, 2001; Nys et al, 2013).

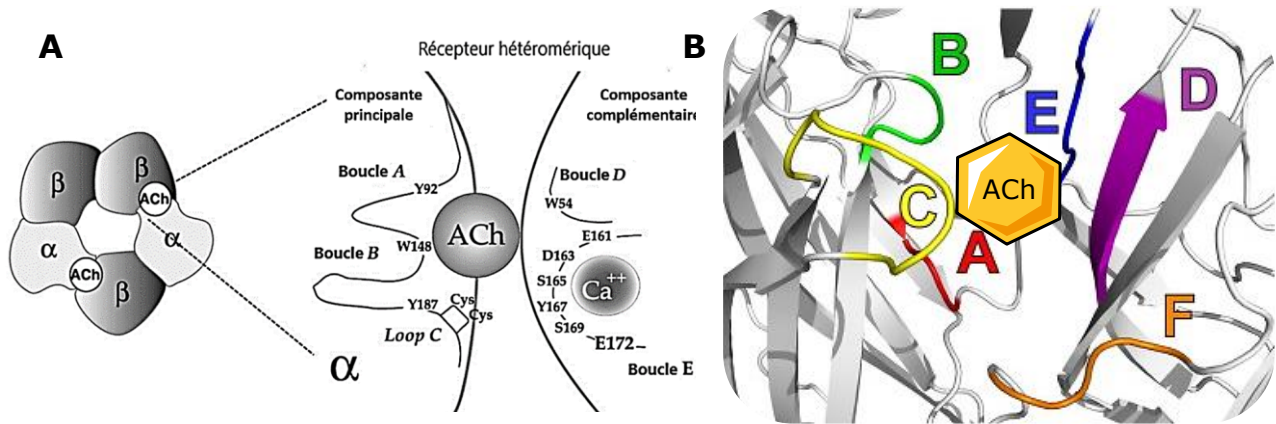


Figure 4. A) Représentation schématisée d'un récepteur nicotinique hétéromérique composé de sous-unités nicotiniques respectant la stœchiométrie $2\alpha:3\beta$. À gauche, on notera la fixation du ligand (ACh) à l'interface d'une composante principale α et d'une composante complémentaire β . Les boucles A, B, C, D et E de la sous-unité $\alpha7$ de poulet sont indiquées (la boucle F n'est pas représentée). B) Modélisation du site de fixation de l'acétylcholine (ACh), les différentes boucles A, B, C de la composante principale et D, E, F de la composante complémentaire sont représentées par un code couleur. Modifiée d'après Itier et Bertrand, 2001 et Nys et al, 2013.

Les boucles A, B et C forment la partie « positive » de cette poche hydrophobe alors que les boucles D, E et F forme la partie « négative » (Albuquerque et al, 2009). Plus récemment, il a été identifié chez les insectes une 7^{ème} boucle extracellulaire, appelée boucle G, qui participerait à l'amélioration de l'interaction électrostatique entre les nAChRs d'insectes et les néonicotinoïdes tels que l'Imidaclopride (Ihara et al, 2015). Des expériences de mutagenèse dirigée sur les boucles C, D, E et G de la sous-unité nicotinique de drosophile $D\alpha1$ formant un récepteur hybride avec la sous unité $\beta2$ de poulet ont montré l'importance de cette boucle dans la sélectivité des néonicotinoïdes (Hikida et al, 2018; Ihara et al, 2018). Ces boucles, formées par la succession des feuilletts β des 2 sous-unités, possèdent des acides aminés aromatiques clés qui formeront une poche hydrophobe propice à la fixation du ligand. Il a été démontré la participation de nombreuses tyrosines dans la formation de cette poche. Chez la torpille, les acides aminés aromatiques de la sous-unité $\alpha1$ qui sont impliqués dans la formation du site de fixation sont en position Tyr93 dans la boucle A, Trp149 dans la boucle B, Tyr190 et Tyr198 dans la boucle C (Sine, 2002; Celie et al, 2004; Unwin, 2005; Albuquerque et al, 2009). Par comparaison avec la sous-unité $\alpha7$ de poulet, ces acides aminés aromatiques sont retrouvés en position Tyr92 (boucle A), Trp148 (boucle B), Tyr187 et Tyr 192 (Boucle C) (Galzi et al, 1991; Itier et Bertrand, 2001; Shimomura et al, 2002). De plus, il a été identifié chez la grande limnée, *Limnea stagnalis*, une protéine capable de lier l'acétylcholine, appelée AChBP (« Acetylcholine Binding Protein »). Celle-

ci présente des caractéristiques similaires aux sous-unités nicotiniques de vertébrés. En effet, l'AChBP correspond fortement, en termes de séquence et de structure, à la partie N-terminale des sous-unités nicotiniques (Brejc et al, 2001). Cette protéine, longue de 210 acides aminés, possède la propriété de s'assembler en homopentamère. Cette protéine étant hydrophile, donc soluble dans l'eau, il a été possible de la concentrer en solution et d'arriver à cristalliser un homopentamère d'AChBP. À l'image des études de cristallographie de Watson et Crick (Watson et Crick, 1953), Wilkins (Wilkins et al, 1951) et Franklin (Franklin et Gosling, 1953) sur la molécule d'ADN, l'étude aux rayons X de la structure cristalline de l'AChBP a permis de mettre en évidence les interactions électroniques de cet homopentamère avec son ligand. La résolution à 2,7 Å de la protéine d'AChBP a ainsi confirmé l'existence des structures en boucles participant à la formation du LBD (Brejc et al, 2001).

Il est intéressant de noter qu'en général, les résidus hydrophobes du site « positif » déterminent l'affinité du ligand, alors que les résidus participant à la partie « négative » détermineront la sélectivité du récepteur pour un ligand de par la conformation spatiale des charges électrostatiques portées par ces acides aminés (Albuquerque et al, 2009).

4. Diversité des sous-unités nicotiniques chez les insectes

Chez les insectes, on observe quelques différences au niveau de la transmission synaptique par rapport aux vertébrés. En effet, cette dernière se fait de manière glutamatergique au niveau de la jonction neuromusculaire (Usherwood, 1994) alors qu'au niveau du système nerveux central, l'acétylcholine est le neurotransmetteur excitateur majoritairement utilisé, laissant ainsi supposer la présence de récepteurs sensibles à l'acétylcholine, et plus particulièrement des récepteurs nicotiniques (Pitman, 1971). Les tissus nerveux des insectes seraient l'une des sources les plus importantes de nAChRs neuronaux (Dudai, 1978; Sattelle, 1980; Breer et Sattelle, 1987; Marshall et al, 1990; Millar et Denholm, 2007). La découverte des nAChRs d'insectes a suivi le même processus que pour les nAChRs de vertébrés avec l'utilisation d' α -bungarotoxine (α -Bgt) radiomarquée. L'utilisation de cette toxine a permis de confirmer la présence d'élément liant cette toxine chez *Drosophila melanogaster* (Schmidt-Nielsen et al, 1977). De plus, ces éléments répondent aux critères établis par Birdsall & Hulme (Birdsall et Hulme, 1976) qui sont : i) l'observation d'une saturation du composant de fixation par un radioligand, démontrant ainsi un nombre fini de sites de fixation, ii) l'observation d'une augmentation de la fixation spécifique d'un radioligand lors de l'ajout de tissu exprimant ce composant de fixation, iii) la possibilité d'observer le déplacement du radioligand par un ligand spécifique à ce récepteur alors qu'une drogue non spécifique à ce récepteur ne doit pas déplacer le radioligand, et enfin iv) une saturation du récepteur par le ligand radiomarqué dans un tissu pour lequel il a été montré pharmacologiquement la présence dudit récepteur. Le marquage par de l' α -Bgt radiomarquée ainsi que le respect des critères de Birdsall & Hulme ont permis de confirmer la présence de récepteurs nicotiniques chez *D. melanogaster*, ainsi que de les localiser

dans la tête et le thorax (Hall et Teng, 1975; Schmidt-Nielsen et al, 1977). Les premières sous-unités nicotiniques d'insectes ont été isolées et clonées chez la drosophile *Drosophila melanogaster* grâce à l'utilisation de sondes à ADN spécifiquement dirigées contre des séquences de sous-unités nicotiniques de torpille ou de poulet. Brièvement, une banque d'ADNc de drosophile a été clonée à l'aide d'un bactériophage de type λ gt11, puis un criblage est réalisé avec les sondes à ADN spécifiques, permettant ainsi l'hybridation de séquences d'intérêt homologues. L'amplification, par clonage, de ses séquences homologues permet la purification et le séquençage de ces protéines (Hermans-Borgmeyer et al, 1986; Jonas et al, 1990; Sawruk et al, 1990). Par exemple, $D\alpha 1$, initialement « α -like-subunit » (ALS), $D\alpha 2$, initialement « second α like subunit of *Drosophila* » (SAD) et $D\beta 1$, initialement « acetylcholine receptor *Drosophila* » (ARD), ont montré des homologies avec des séquences identifiées comme étant des sous-unités α et β neuronales de vertébrés (Bossy et al, 1988; Sawruk et al, 1990; Schloss et al, 1991). La nomenclature de $D\alpha 1$ fait référence au fait qu'elle fut la première sous-unité nicotinique d'insecte découverte. En effet, la plus grande similarité retrouvée entre $D\alpha 1$ et une sous-unité nicotinique neuronale de vertébré correspond à l' $\alpha 2$ de poulet avec 44% d'identité (Bossy et al, 1988). Il a été montré depuis, par analyse génomique (Altschul et al, 1990; Grauso et al, 2002), que les sous-unités retrouvées chez les insectes sont moins nombreuses que chez les vertébrés et certains helminthes, allant de 10 à 12 gènes chez les insectes contre 16 à 29 chez les humains et les nématodes, respectivement (Jones et Sattelle, 2004, 2010). Il a ainsi été trouvé des gènes codants pour différentes sous-unités nicotiniques chez de nombreux insectes, tels que *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Bombyx mori*, *Tribolium castaneum*, *Locusta migratoria*, *Acyrtosiphon pisum*, *Nilaparvata Lugens*, *Heliothis virescens*, *Myzus Persicae* et *Periplaneta americana* (Tableau 1).

Groupes Espèces	Groupe α 1	Groupe α 2	Groupe α 3	Groupe α 4	Groupe α 5- α 7	Groupe β 1	Groupe β 2/ α 8	Groupe divergent	Ref
<i>Drosophila melanogaster</i>	D α 1 (ALS)	D α 2 (SAD)	D α 3	D α 4	D α 5 D α 6 D α 7	D β 1 (ARD)	D β 2 (SBD)	D β 3	Jones et Sattelle, 2010
<i>Anopheles gambiae</i>	Agam α 1	Agam α 2	Agam α 3	Agam α 4	Agam α 5 Agam α 6 Agam α 7	Agam β 1	Agam α 8	Agam α 9	Jones et Sattelle, 2010
<i>Apis mellifera</i>	Amel α 1	Amel α 2	Amel α 3	Amel α 4	Amel α 5 Amel α 6 Amel α 7	Amel β 1	Amel α 8 (Apis α 3)	Amel α 9 Amel β 2	Jones et Sattelle, 2010
<i>Bombyx mori</i>	Bmor α 1	Bmor α 2	Bmor α 3	Bmor α 4	Bmor α 5 Bmor α 6 Bmor α 7	Bmor β 1	Bmor α 8	Bmor α 9 Bmor β 2 Bmor β 3	Jones et Sattelle, 2010
<i>Tribolium castaneum</i>	Tcas α 1	Tcas α 2	Tcas α 3	Tcas α 4	Tcas α 5 Tcas α 6 Tcas α 7	Tcas β 1	Tcas α 8 Tcas α 11	Tcas α 9 Tcas α 10	Jones et Sattelle, 2010
<i>Locusta migratoria</i>	Loc α 1	Loc α 2	Loc α 3	Loc α 4	Loc α 5 Loc α 6 Loc α 7	Loc β 1	Loc α	Loc α 9 Loc β 2	Wang et al, 2015
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Apisum α 1	Apisum α 2	Apisum α 3	Apisum α 4	Apisum α 6 Apisum α 7	Apisum β 1	Apisum α 8	Apisum β 2 Apisum α 9 Apisum α 10	Dale et al, 2010; Liu et al, 2013
<i>Nilaparvata lugens</i>	Nl α 1	Nl α 2	Nl α 3	/	/	Nl β 1	Nl α 8 Nl β 2	/	Li et al, 2010; Cartereau et al, 2020
<i>Heliothis virescens</i>	/	Hv α 2	Hv α 1	/	Hv α 7-1 Hv α 7-2	Hv β 1	Hv α 3	/	Jones et al, 2005
<i>Myzus persicae</i>	Mp α 2	Mp α 1	Mp α 3	Mp α 5	Mp α 7-1 Mp α 7-2	Mp β 1	Mp α 4	/	Huang et al. 1999, 2000
<i>Periplaneta americana</i>	Pa α 1	Pa α 2	Pa α 3	Pa α 4	Pa α 6 Pa α 7	Pa β 1	Pa α 8	/	Benzidane et al, 2017; Sun et al, 2017

Tableau 1. Tableau non exhaustif recensant les sous-unités nicotiniques chez différentes espèces d'insectes. Le classement des sous-unités par famille correspond à l'identité la plus élevée vis-à-vis des sous-unités nicotiniques découvertes chez la drosophile *Drosophila melanogaster*. Les cases vides ne signifient pas que la sous-unité est absente chez cette espèce, elle peut ne pas être décrite à l'heure actuelle.

Ces gènes sont répartis selon 8 groupes définis par rapport à la nomenclature des sous-unités nicotiniques de drosophile, elles-mêmes basées sur l'homologie de séquences avec les sous-unités nicotiniques de vertébrés. Les sous-unités α sont divisées en 5 groupes nommés α 1, α 2, α 3, α 4 et α 5- α 7 alors que les sous-unités β sont différenciées en 2 groupes appelés β 1 et β 2. À ceci, un dernier groupe constitué de sous-unités divergentes a été ajouté. Le groupe appelé « α 5- α 7 » rassemble les sous-unités α 5, α 6 et α 7 car ces sous-unités présentent une forte homologie avec la sous-unité α 7 de vertébrés. On retrouve des sous-unités α 7-like chez les nématodes et trématodes (Bentley et al, 2004) suggérant qu'une sous-unité α 7 ancestrale commune aux vertébrés et invertébrés ait divergé au cours de l'évolution (Jones et Sattelle, 2010). Les groupes α 1, α 2, α 3, α 4, β 1 et α 8/ β 2 d'insectes partagent une caractéristique commune non retrouvée chez les vertébrés. Celle-ci correspond à l'insertion d'une séquence peptidique d'une dizaine d'acides aminés située dans la boucle F décrite par Shimomura (Shimomura et al, 2004; Jones et Sattelle, 2010). Cette caractéristique, soit l'insertion de 9 à

10 acides aminés, semble également être retrouvée chez *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Bombyx mori* et *Tribolium castaneum* pour leurs sous-unités nicotiniques appartenant aux groupes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\beta 2$ (Jones et Sattelle, 2010). Ces acides aminés présents dans la boucle F contribueraient à l'interaction des sous-unités nicotiniques d'insecte avec des insecticides tels que l'Imidaclopride (Shimomura et al, 2004; Yao et al, 2008; Jones et Sattelle, 2010). Le groupe de sous-unités divergentes rassemble les sous-unités possédant des séquences trop éloignées phylogénétiquement des groupes décrits précédemment. Ces sous-unités divergentes présentent une faible homologie de séquence peptidique, moins de 29% d'identité, avec les autres sous-unités nicotiniques d'insectes. Elles ont la caractéristique d'avoir une boucle intracellulaire plus courte entre les domaines transmembranaires M3 et M4. De plus, il semblerait que certains motifs particuliers au sein de ces sous-unités divergentes joueraient un rôle dans le fonctionnement des récepteurs nicotiniques. Par exemple, les acides aminés G, E et K qui se situent en amont du domaine transmembranaire 2 et qui sont importants pour la sélectivité cationique des nAChRs (Jensen et al, 2005) sont manquants chez certaines espèces. C'est le cas pour la sous-unité $\alpha 9$ de *Tribolium castaneum* et *Bombyx mori* (Jones et Sattelle, 2007; Shao et al, 2007). Le rôle précis des sous-unités divergentes reste encore à élucider. Néanmoins, la nature, α ou β , ou le nombre de sous-unités divergentes exprimées serait spécifique à une espèce donnée. Ainsi, les récepteurs nicotiniques comprenant ces sous-unités divergentes induiraient des réponses propres à chaque espèce (Jones et Sattelle, 2010). Les sous-unités nicotiniques divergentes participeraient aussi à la formation de récepteurs nicotiniques en favorisant l'assemblage de ces derniers. En effet, Lansdell et Millar (Lansdell et Millar, 2002) ont démontré, *via* un test d'affinité utilisant de l'épibatidine radiomarquée, que la co-expression de la sous-unité $D\beta 3$ avec les sous-unités $D\alpha 3$ et $\beta 2$ de rat augmentait de 50% la liaison spécifique à ce radioligand comparée à la co-expression simple de $D\alpha 3$ et $\beta 2$. Cette augmentation ne proviendrait pas de l'augmentation de l'affinité du récepteur nicotinique pour l'épibatidine car le coefficient d'affinité entre les deux conditions ($D\beta 3 + D\alpha 3 + \beta 2$ et $D\alpha 3 + \beta 2$) ne variait pas significativement. Cela laisse donc supposer que la co-expression de la sous-unité divergente $D\beta 3$ avec $D\alpha 3$ et $\beta 2$ entraîne une augmentation du nombre de sites de fixation pour l'épibatidine. Ainsi, la sous-unité $D\beta 3$ favoriserait l'expression de ces récepteurs nicotiniques sensibles à l'épibatidine (Lansdell et Millar, 2002).

La diversité réduite en sous-unités nicotiniques chez les insectes, comparée aux 16 et 29 gènes codants pour des sous-unités nicotiniques retrouvées respectivement chez les vertébrés et invertébrés (Jones et Sattelle, 2010), pourrait être compensée par l'épissage alternatif. En effet, il a été montré que certains gènes codants pour les sous-unités $\alpha 4$ d'insectes, pouvaient être épissés alternativement, formant ainsi une sous-unité possédant une version alternative d'un exon précis. C'est le cas par exemple de l'exon 4 et de l'exon 4' chez la drosophile *Drosophila melanogaster* (Lansdell et Millar, 2000) et chez l'abeille domestique *Apis mellifera* (Jones et al, 2006). Chez la drosophile, la sous-unité $D\alpha 4^{\text{Exon4}'}$ s'assemble moins efficacement avec la sous-unité $\beta 2$ que la sous-unité $D\alpha 4^{\text{Exon4}}$. Ceci a pu être démontré de la même manière que pour la

sous-unité divergente D β 3. En effet, il a été montré que la quantité totale d'épibatidine radiomarquée fixée est plus importante pour les récepteurs D α 4^{Exon4}/ β 2 que pour les récepteurs D α 4^{Exon4'}/ β 2. L'affinité respective de l'épibatidine radiomarquée pour ces 2 récepteurs n'étant pas significativement différente, l'augmentation de la quantité totale de radioligands fixés s'explique par l'augmentation du nombre de récepteurs matures à la membrane. Le niveau d'expression de D α 4^{Exon4} et D α 4^{Exon4'} étant sensiblement le même, il a été conclu que l'assemblage de la sous-unité nicotinique D α 4^{Exon4'} avec β 2 en un récepteur hétéropentamérique mature s'effectuait moins efficacement que pour la sous-unité D α 4^{Exon4} avec β 2 (Lansdell et Millar, 2000). Chez l'abeille, la présence de l'exon 4 ou 4' du transcrite Amel α 4 se fait en fonction du stade de développement. La forme Amel α 4^{Exon4} est exprimée à tous les stades de développement alors que Amel α 4^{Exon4'} est exprimée uniquement aux stades pupes et adulte (Jones et al, 2006). Il a aussi été rapporté un épissage alternatif concernant les exons 3 et 8 de la sous-unité α 6 de drosophile (Grauso et al, 2002), de moustique (Jones et al, 2005), d'abeille (Jones et al, 2006) et de bombyx (Shao et al, 2007). En fonction des espèces concernées, l'épissage ne produit pas le même nombre de sous-unités alternatives. Il a été observé chez le moustique *Anopheles gambiae* et le bombyx du mûrier *Bombyx mori* 2 exons 8 alternatifs, alors que chez la drosophile *Drosophila melanogaster* et l'abeille domestique *Apis mellifera* 3 exons 8 alternatifs sont possibles (Jin et al, 2007), produisant ainsi 3 isoformes différentes. En prenant en considération également l'épissage alternatif de l'exon 3 chez ces quatre espèces, il apparaît que le nombre d'isoformes α 6 possibles peut varier grandement d'une espèce à l'autre. L'épissage alternatif permet alors de diversifier considérablement les sous-unités nicotiniques exprimées, chacune ayant des propriétés potentiellement différentes à partir d'une unique séquence nucléotidique.

Un deuxième mécanisme, différent de l'épissage alternatif des gènes, entraîne la modification ponctuelle de la séquence nucléotidique. Ce mécanisme moléculaire, appelé édition de l'ARN, est une modification post-transcriptionnelle s'effectuant sur un pré-ARNm nucléaire par l'adénosine désaminase agissant sur l'ARN (ADAR) (Bass, 2002; Seeburg, 2002). L'ADAR catalyse une réaction de désamination de l'adénosine la transformant en inosine (Figure 5).

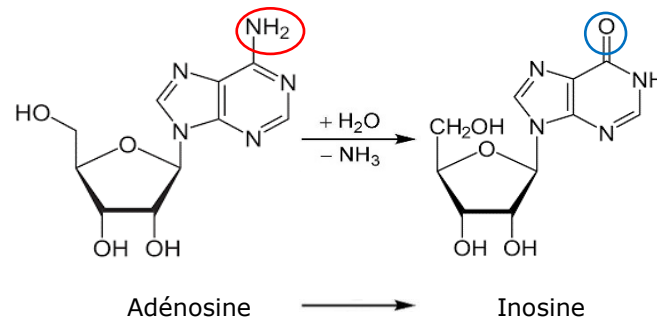


Figure 5. Schéma de la réaction de désamination catalysée par l'adénosine désaminase (ADAR). L'élimination du groupement amine (NH₂), entouré en rouge, laisse place à un groupement hydroxyle (OH) entouré en bleu, formant ainsi une molécule d'inosine.

Lors de la traduction, l'inosine est interprétée de la même manière qu'une guanosine. Ainsi, l'adénosine initialement présente se retrouve donc considérée comme une guanosine lors de l'incorporation de l'acide aminé dans la chaîne peptidique. Il est alors possible qu'une thréonine, codée par les bases azotées « ACC » soit considérée comme une alanine, codée par les bases azotées « GCC » (ou « ICC »), après l'action de l'ADAR sur ce triplet de nucléotides. Par conséquent, l'acide aminé incorporé dans la séquence protéique est différent de celui initialement prévu. Il semblerait que l'édition d'ARN soit particulièrement impliquée dans la modification de pré-ARNm codant pour des gènes acteurs de la signalisation neuronale, tels des canaux dépendants du potentiel, des récepteurs inotropes ainsi que des récepteurs couplés à une protéine G, aussi bien chez les mammifères que chez les invertébrés (Reenan, 2001). En ce qui concerne les sous-unités nicotiniques, ce mécanisme a été montré chez différentes espèces d'insectes (Jones et Sattelle, 2010). Ces modifications d'acides aminés ont des répercussions sur l'encombrement stérique de la protéine, mais aussi sur la charge électrique de la protéine, aboutissant à des modifications des propriétés des sous-unités nicotiniques en fonction de la région éditée (Jin et al, 2007). La comparaison des séquences génomiques et nucléotidiques des transcrits de la sous-unité $\alpha 6$ chez *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*, *Tribolium castaneum* et *Apis mellifera* ont permis de mettre en évidence des éditions de l'ARN assez fréquentes (Jin et al, 2007). L'édition d'ARN chez ces espèces a montré que les changements de nucléotides entraînaient une modification de la séquence protéique dans la boucle E. Or, cette boucle dans la partie N-terminale de la sous-unité nicotinique participe à la formation du site de fixation du ligand. Le remplacement d'un acide aminé par un autre dans cette région pourrait changer les interactions électrostatiques qui ont lieu entre le ligand et le site de fixation, ayant pour conséquence une modification des propriétés de fixation du ligand (Grauso et al, 2002). Il a également été trouvé, au niveau de la sous-unité $D\alpha 6$ chez *Drosophila melanogaster*, des éditions d'ARN dans le domaine TM2 qui participe à la formation du canal ionique du récepteur nicotinique. Ainsi, une altération des acides aminés le constituant modifiera la perméabilité et la sélectivité du récepteur nicotinique (Grauso et al, 2002). Ce mécanisme est relativement

conservé chez les insectes, car il est retrouvé chez les hyménoptères, les coléoptères, les lépidoptères et les diptères. Néanmoins, il existe certaines exceptions, c'est le cas chez les culicidae, pour lesquels l'édition d'ARN n'a pas été retrouvée dans les sous-unités $\alpha 5$, $\alpha 6$ et $\beta 1$ (Jones et al, 2005; Jin et al, 2007). En effet, l'analyse génomique des séquences d'*An. gambiae* a montré que la position de certaines guanosines chez cette espèce correspondait à des sites d'édition d'ARN chez d'autres espèces (Jin et al, 2007; Jones et Sattelle, 2010). Or, les transcrits codants ces sous-unités ne présentaient aucune édition (Jones et al, 2005). Ceci laisse ainsi penser que ce mécanisme moléculaire permettrait à une séquence génomique d'être conservée au sein d'un même phylum, car indispensable pour celui-ci, tout en augmentant la diversité des protéines exprimées au sein d'une espèce. En prenant en considération l'expression spatio-temporelle des sous-unités nicotiniques, il s'avère qu'il existe une très grande variété de combinaisons possibles de sous-unités aboutissant à la formation de récepteurs nicotiniques. La composition variable en sous-unités nicotiniques va influencer les propriétés pharmacologiques de récepteurs nicotiniques d'insectes (Lansdell et Millar, 2000; Tomizawa et al, 2005; Thany et al, 2007).

5. Pharmacologie des récepteurs nicotiniques d'insectes

La pharmacologie des récepteurs nicotiniques d'insectes a été établie à partir des données issues d'analyse des récepteurs natifs ainsi qu'à partir de données obtenues grâce à l'expression des sous-unités nicotiniques dans un système hétérologue. La classification des récepteurs nicotiniques d'insectes s'est faite de manière similaire à celle des récepteurs nicotiniques de vertébrés. Il a été mis en évidence que les insectes possèdent 2 classes de récepteurs nicotiniques pharmacologiquement distinctes : les récepteurs insensibles à l' α -bungarotoxine et les récepteurs sensibles à l' α -bungarotoxine (Breer et al, 1985; Breer et Sattelle, 1987; Buckingham et al, 1997; Courjaret et Lapied, 2001). De plus, il a été montré chez la blatte *Periplaneta americana*, l'abeille domestique *Apis mellifera* et la drosophile *Drosophila melanogaster* que les récepteurs nicotiniques classés selon ces 2 profils pharmacologiques possèdent des agonistes et antagonistes différents en fonction du type cellulaire dans lequel ils sont exprimés (Tableau 2).

Pharmacologie		α -bungarotoxine sensible	α -bungarotoxine résistant	Références
Type cellulaire				
<i>Periplaneta americana</i>	« Dorsal unpaired median » neurones	(+) Clo, Imi, Nic, ACh (-) α -Bgt, Mec, α -CTX	nAChR1 : (+) Clo, Imi (-) δ -TC ; nAChR2 : (+) Clo (-) Mec, α -CTX ;	Courjaret et Lapied, 2001; Courjaret et al, 2003; Bodereau-Dubois, 2011; Bodereau-Dubois et al, 2012; Calas-List et al, 2012; Calas-List et al, 2013; Taillebois, 2014; Sun et al, 2017
	Motoneurones	(+) ACh, Nic, (-) 5-HT, Dop, Oct, α -Bgt	Pas de récepteur nicotinique résistant à l' α -Bgt décrit dans ces cellules.	Lane et al, 1982; Butt et Pitman, 2002
	Neurones de ganglion thoracique	nAChN : (+) ACh, Clo, Épi, Imi, Spi A (-) α -Bgt, MLA, CDP, δ -TC nAChD : (+) ACh, Clo, Épi, Imi (-) α -Bgt, Dh β E, CDP, MLA	Pas de récepteur nicotinique résistant à l' α -Bgt décrit dans ces neurones.	Salgado et Saar, 2004 ; Salgado, 2016
<i>Apis mellifera</i>	Cellules de Kenyon	(+) Entier : ACh, CbCh Partiel : Nic, Épi, Cyt, Imi (-) Entier : α -Bgt, Dh β E, MLA Partiel : Mec, δ -TC, Hex	(+) : ACh, CbCh, Nic (au stade de puppe)	Goldberg et al, 1999; Deglise et Gru, 2002; Wustenberg, 2004; Dupuis et al, 2011
	Neurones du lobe antennaire (LA)	(+) : ACh, Nic, Imi, Épi (-) : α -Bgt, Dh β E, MLA	(-) : Mec	Deglise et al, 2002; Gauthier et al, 2006; Barbara et al, 2008; Dupuis et al, 2011
<i>Drosophila melanogaster</i>	Cellules de Kenyon	(+) : ACh, (-) : α -Bgt	Pas de récepteur nicotinique résistant à l' α -Bgt décrit dans ces cellules	Su et O'Dowd, 2003; Gu et O'Dowd, 2006

Tableau 2. Tableau non exhaustif des profils pharmacologiques des récepteurs nicotiniques natifs, sensibles et insensibles à l' α -bungarotoxine, étudiés chez la blatte *Periplaneta americana*, l'abeille *Apis mellifera* et la drosophile *Drosophila melanogaster*. Les abréviations utilisées sont : α -Bgt : α -bungarotoxine, ACh : Acétylcholine Clo : Clothianidine, Nic : Nicotine, Épi : Epibatidine, Imi : Imidaclopride, δ -TC : δ -tubocurarine, α -CTX : α -Conotoxine, CDP : Condelphine, Mec : Mécamylamine, MLA ; Méthyllycaconitine, 5-HT : 5-hydroxytryptamine, Dop : Dopamine, Oct : Octopamine, CbCh : Carbamylcholine, Cyt : Cytisine, Spi A : Spinosyn A, Dh β E : Dihydro- β -érythroïdine, Hex : Hexaméthonium, (+) : Agoniste, (-) : Antagoniste. Modifié d'après Thany et al, 2006.

Chez la blatte *Periplaneta americana*, les 2 sous-types ont été bien décrits dans les neurones dorsaux impairs médians appelés neurones DUM (« Dorsal Unpaired Median »). Les récepteurs sensibles à l' α -bungarotoxine ont pour agonistes la nicotine et l'acétylcholine et se retrouvent bloqués par l' α -bungarotoxine, la mécamylamine, l' α -conotoxine et la δ -tubocurarine. De plus, la Clothianidine et l'Imidaclopride, qui sont les insecticides néonicotinoïdes, agissent comme agonistes sur ces récepteurs sensibles à l' α -Bgt (Courjaret et Lapied, 2001; Thany, 2009; Calas-List et al, 2013). À ce jour, parmi les récepteurs insensibles à l' α -bungarotoxine, on observe deux types de récepteurs, nAChR1 et nAChR2, qui se distinguent, entre autres, par leur

pharmacologie. La Clothianidine est un agoniste de ces 2 sous-types de récepteurs alors que seul nAChR1 est activé par l'Imidaclopride. En ce qui concerne les antagonistes, la δ -Tubocurarine bloque uniquement nAChR1 alors que l'activité de nAChR2 est bloquée par la mécamylamine et l' α -conotoxine. La différence la plus importante entre ces 2 récepteurs est que l'Imidaclopride ne présente aucun effet sur le récepteur nAChR2 (Courjaret et Lapied, 2001). La caractérisation de la composition de nAChR1 et nAChR2 en sous-unités nicotiniques a été réalisée récemment (Sun et al, 2017). Ceci a été rendu possible grâce à l'utilisation d'ARN interférent ciblant les sous-unités nicotiniques, Pa α 1, Pa α 2, Pa α 3, Pa α 6, Pa α 8 et Pa β 1 sur des neurones DUM provenant du 6^{ème} ganglion abdominal de blatte. Puis, en fonction des ARN interférents utilisés, les réponses pharmacologiques des neurones DUM à différents agonistes ont été mesurées électrophysiologiquement. Cette approche a permis de comprendre l'implication de chaque sous-unité dans la réponse pharmacologique des récepteurs nicotiniques exprimés par les neurones DUM. Les récepteurs combinant les sous-unités Pa α 1, Pa α 2 et Pa β 1 présentaient une sensibilité différente à l'Imidaclopride comparés aux récepteurs possédant les sous-unités Pa α 3, Pa α 8 et Pa β 1. Dans l'étude de Sun et ses collègues (Sun et al, 2017), l'utilisation d'ARNi ciblant Pa α 1, Pa α 2 ou Pa β 1 entraîne une diminution du courant nicotinique pour des potentiels imposés compris entre -30mV et +20mV. De plus, les courants induits par l'application d'Imidaclopride ne semblent pas être affectés par la diminution d'expression de Pa α 1, Pa α 2 ou Pa β 1. Ce premier élément montre que la réponse à l'Imidaclopride ne dépend pas de récepteurs composés des sous-unités Pa α 1, Pa α 2 ou Pa β 1. De plus, la diminution d'expression de la sous-unité Pa α 1 entraîne une perte de sensibilité à l' α -conotoxine. Les auteurs montrent ainsi l'implication de ces 3 sous-unités dans la formation d'un sous-type de récepteur qui est : i) activé par la nicotine ii) non impliqué dans la réponse à l'Imidaclopride et iii) sensible à l' α -conotoxine. Ces résultats indiquent donc que le sous-type nAChR2 est composé des sous-unités Pa α 1, Pa α 2 et Pa β 1 (Courjaret et Lapied, 2001; Bodereau-Dubois et al, 2012). De manière similaire, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre les sous-unités Pa α 3, Pa α 8 ou Pa β 1 conduit à la diminution des courants induits par l'application de nicotine pour des potentiels imposés compris entre -90mV et -30mV. En présence des ARNi ciblant ces 3 sous-unités, l'amplitude des courants induits par l'application d'Imidaclopride est diminuée. Cela montre que sur les neurones DUM, la réponse à l'Imidaclopride en présence d' α -Bgt dépend de ces sous-unités. Les auteurs montrent ainsi l'implication de ces 3 sous-unités dans la formation d'un sous-type de récepteur qui est i) activé par la nicotine et ii) impliqué dans la réponse à l'Imidaclopride. En présence d' α -Bgt, seul le récepteur nAChR1 des neurones DUM correspond à ces éléments (Courjaret et Lapied, 2001; Courjaret et al, 2003). Les auteurs concluent ainsi que ce dernier est composé des sous-unités nicotiniques Pa α 3, Pa α 8 et Pa β 1. La précision de la composition en sous-unités nicotiniques chez ces 2 sous-types de récepteurs aux pharmacologies différentes permet de mieux comprendre l'importance de la combinaison en sous-unités nicotiniques des récepteurs dans la modulation des propriétés pharmacologiques de ces récepteurs.

La pharmacologie d'autres récepteurs nicotiniques a été décrite dans les motoneurons de blattes. Les récepteurs sensibles à l' α -Bgt sont activés par l'acétylcholine, la nicotine et la carbamylcholine. De plus, il a été montré que la 5-hydroxytryptamine, la dopamine et l'octopamine modulent la réponse cholinergique de ces récepteurs (Butt et Pitman, 2002). Il ne semble pas y avoir de récepteurs nicotiniques insensibles à l' α -Bgt dans ces cellules, car en présence d' α -Bgt, aucune variation de potentiel membranaire n'a été observée après l'application d'acétylcholine sur le corps cellulaire de ces motoneurons (Lane et al, 1982). Des récepteurs nicotiniques sensibles à l' α -Bgt ont également été caractérisés dans les neurones des ganglions thoraciques de la blatte *Periplaneta americana* (Salgado et Saar, 2004; Salgado, 2016). Ces récepteurs ont été classés en 2 sous-types nommés nAChN (« non desensitized nicotinic acetylcholine receptors ») et nAChD (« Desensitized nicotinic acetylcholine receptors »). Les récepteurs nAChD se désensibilisent en présence d'Imidaclopride à une concentration de 100 nM. Ce phénomène de désensibilisation en présence d'une faible concentration en Imidaclopride est utilisé afin d'étudier uniquement le récepteur nAChN. Les nAChD présentent une affinité importante pour l' α -Bgt ($CI_{50} = 21$ nM), la condelphine ($CI_{50} = 0,39$ nM) et la méthyllycaconitine ($CI_{50} = 1,05$ nM). Quant aux récepteurs nAChN, ils sont nommés ainsi car, contrairement aux récepteurs nAChD, ils ne se désensibilisent pas en présence d'acétylcholine, de Clothianidine, d'épibatidine ou d'Imidaclopride. Des études électrophysiologiques montrent que les récepteurs nAChN possèdent une grande affinité pour les antagonistes tels que la méthyllycaconitine ($CI_{50} = 17$ pM), l' α -Bgt ($CI_{50} = 1,3$ nM) et la condelphine ($CI_{50} = 0,65$ nM). L'affinité très importante des nAChN pour la méthyllycaconitine, 63 fois plus importante que pour nAChD, est utilisée afin d'étudier spécifiquement la pharmacologie du récepteur nAChD (Salgado et Saar, 2004; Salgado, 2016). L'état désensibilisé du récepteur nAChD en présence d'une faible concentration d'agonistes est particulièrement intéressant dans un contexte d'intoxication aiguë chez les insectes. L'effet insecticide de certains agonistes nicotiniques se manifeste à partir d'une concentration de l'ordre de la micromole dans l'hémolymphe d'insecte (Greenwood et al, 2002; Salgado et Saar, 2004). Or, pour ces concentrations, les nAChD sont déjà désensibilisés et ne peuvent donc pas participer à la stimulation prolongée des cellules nerveuses lors d'une intoxication. Ceci suggère que les symptômes observés à une dose aiguë d'insecticide sont associés, entre autres, à l'activation continue des récepteurs de type nAChN (Salgado et Saar, 2004).

Chez l'abeille *Apis mellifera*, il a aussi été montré l'existence de récepteurs nicotiniques sensibles et insensibles à l' α -Bgt. La pharmacologie des récepteurs nicotiniques exprimés dans les cellules de Kenyon d'abeille au stade pupa a été caractérisée dans de nombreuses études grâce à la technique de patch-clamp (Goldberg et al, 1999; Deglise et Gru, 2002; Wustenberg, 2004). Les nAChRs sensibles à l' α -Bgt présentent un profil pharmacologique relativement bien décrit. L'acétylcholine et la carbamylcholine sont des agonistes pleins alors que l'application d'Imidaclopride, de nicotine, de cytosine et d'épibatidine induisent un courant dont l'amplitude ne représente, respectivement, que 36%, 33%, 22% et 31% de l'amplitude maximale d'un

courant atteint par l'application de 200 μ M d'ACh, les classant ainsi comme agoniste partiel (Deglise et Grünewald, 2002; Wüstenberg et Grünewald, 2004). Il est intéressant de noter que la cytisine est un agoniste plein pour les récepteurs nicotiniques de vertébrés de type $\alpha_3\beta_4$ et α_7 (Picciotto et al, 1995) ou partiel pour les $\alpha_4\beta_2$ (Mineur et al, 2007). Les études électrophysiologiques ont également montré que l'activité de ces récepteurs nicotiniques était bloquée par l' α -Bgt, le dihydroxy- β -érythroïdine, la méthyllycaconitine et la mécamylamine. Seules ces 3 dernières molécules ont un effet antagoniste réversible. Les antagonistes partiels comme la δ -tubocurarine et l'héxaméthonium inhibent à 90% et 70%, respectivement, l'amplitude du courant induit par l'application d'acétylcholine (200 μ M). En ce qui concerne les nAChRs insensibles à l' α -Bgt exprimés dans les cellules de Kenyon de pupes d'abeilles, Goldberg et ses collègues (Goldberg et al, 1999) ont pu montrer que le courant induit par l'application d'acétylcholine n'était pas complètement bloqué en présence d' α -Bgt et d'atropine. Il a été proposé pour ce modèle cellulaire que 80% du courant cholinergique impliquerait la participation de nAChRs sensibles à l' α -Bgt et que les 20% restant seraient liés à l'activité des nAChRs insensibles à l' α -Bgt.

Chez l'abeille adulte, on retrouve au niveau des lobes antennaires des récepteurs nicotiniques présentant une pharmacologie légèrement différente de celle observée chez les pupes. Chez l'adulte, l'effet de l' α -bgt est réversible alors qu'il est irréversible chez la pupes. De plus, l'amplitude des courants induits par l'application de nicotine et d'Imidaclopride est plus importante et plus variable que chez l'adulte, suggérant ainsi une sensibilité potentiellement plus importante de ces cellules à ces insecticides (Goldberg et al, 1999; Deglise et Grünewald, 2002; Wüstenberg et Grünewald, 2004; Barbara et al, 2008). Il a également été montré des différences entre les cellules de Kenyon chez la pupes et les cellules du lobe antennaire chez les adultes. Il s'avère que la nicotine et l'Imidaclopride présentent un effet plus important chez les abeilles adultes que chez les pupes, alors que les effets antagonistes de la méthyllycaconitine et de la dihydro- β -érythroïdine y sont moins importants (Barbara et al, 2008). Enfin, les cellules de Kenyon issues d'abeille adulte ont des profils pharmacologiques similaires à ceux obtenus sur des cellules du lobe antennaire et sur des cellules de Kenyon chez la pupes (Dupuis et al, 2011). Néanmoins, les affinités ainsi que l'amplitude des réponses obtenues lors de l'application d'agonistes sur des cellules à ces 2 stades de développement sont différentes. Il a été observé une diminution de l'affinité de l'ACh et de la nicotine chez l'adulte. De plus, l'amplitude maximale des courants induits par l'application d'ACh est 7 fois plus faible chez l'abeille adulte, montrant une modification de l'efficacité de l'ACh lors du développement. De même, on observe une modification de l'effet agoniste de la nicotine qui agit comme un agoniste plein sur les cellules de Kenyon d'abeilles adultes, alors que l'effet agoniste est partiel chez la pupes. Enfin, l'effet antagoniste de la méthyllycaconitine et de la dihydro- β -érythroïdine est beaucoup plus important sur les cellules de Kenyon chez la pupes que chez l'adulte (Dupuis et al, 2011; Dupuis et al, 2012). Ainsi, les nAChRs d'abeille présentent une pharmacologie différente en fonction du type neuronal et du stade de développement. Cette variabilité pourrait être expliquée par l'expression

spatio-temporelle de sous-unités nicotiques. En effet, des expériences d'hybridation *in situ* et de RT-PCR ont été réalisées à différents stades de développement et sur différentes structures ou tissus chez l'abeille adulte afin de déterminer si les différentes sous-unités nicotiques sont exprimées différemment au cours du développement et dans des régions différentes (Thany et al, 2005; Jones et al, 2006). Les expériences de RT-PCR ont montré qu'à l'exception du variant Amel α 4 exon4', tous les transcrits étaient présents à tous les stades de développement et dans tous les tissus testés (Jones et al, 2006). Grâce à la technique d'hybridation *in situ*, des différences ont pu être observées dans la localisation des transcrits codants, par exemple, pour la sous-unité Amel α 7 (Thany et al, 2005). Les transcrits Amel α 7 sont observés au niveau des lobes optiques chez l'abeille adulte, mais pas chez la pupa. Par contre, au niveau des corps pédonculés, ces transcrits se trouvent au stade pupa dans les cellules de Kenyon situées à l'extérieur des calices alors qu'au stade adulte, on les trouve dans les cellules de Kenyon localisées à l'extérieur et à l'intérieur des calices (Thany et al, 2005). Afin de déterminer si les différentes sous-unités nicotiques sont présentes dans le même type cellulaire, une étude utilisant la RT-PCR sur cellule unique a été réalisée sur les cellules de Kenyon et sur les cellules du lobe antennaire (Dupuis et al, 2011). Dans les cellules de Kenyon, il a été rapporté l'expression des sous-unités α 2, α 8, β 1 ainsi qu'une expression plus faible d' α 7 pour 1/6^{ème} des cellules de Kenyon testées. Dans les cellules du lobe antennaire, seules les sous-unités α 2, α 8 et β 1 ont été retrouvées. Ainsi, ces différentes sous-unités nicotiques sont susceptibles de s'assembler pour former des nAChRs fonctionnels. La différence de pharmacologie des récepteurs nicotiques dans ces 2 types cellulaires pourrait s'expliquer par la présence ou non de la sous-unité Amel α 7.

Enfin, chez la drosophile *Drosophila melanogaster*, la présence de nAChRs a été démontrée grâce à l'étude des courants post-synaptiques spontanés dans les cellules de Kenyon (Su et O'Dowd, 2003). En présence de picrotoxine (PTX), un bloqueur des récepteurs au GABA et de certains GluClIs (Raymond et Sattelle, 2002), l'ajout d' α -Bgt bloque la génération de courants post-synaptiques excitateurs spontanés initialement observés sur les cellules de Kenyon. L'application de 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) et d'acide phosphonopentanoïque (APV), antagonistes des récepteurs au glutamate, ne bloque pas la formation de ces courants postsynaptiques excitateurs, renforçant l'hypothèse que des nAChRs sensibles à l' α -Bgt étaient impliqués dans la formation de ces courants (Su et O'Dowd, 2003; Gu et O'Dowd, 2006).

6. Facteurs modulant les propriétés pharmacologiques des nAChRs

Nous préciserons, dans cette partie, le phénomène de modulation de la réponse des récepteurs nicotiniques en fonction des sous-unités nicotiniques qui les composent. Nous nous appuyerons sur des résultats obtenus chez 4 insectes d'intérêt : la drosophile *Drosophila melanogaster* qui est un insecte modèle dont les sous-unités nicotiniques sont couramment étudiées, le puceron *Myzus Persicae* considéré comme un ravageur de culture pour lequel l'Imidaclopride est couramment utilisée, la cicadelle brune *Nilaparvata lugens* dont les résultats portant sur récepteurs nicotiniques présentent des ressemblances avec ceux obtenus chez la blatte américaine *Periplaneta americana* qui est notre modèle biologique dans cette étude.

6.1. Modifications des propriétés pharmacologiques en fonction de la combinaison en sous-unités des nAChRs

Afin d'étudier plus précisément la pharmacologie des récepteurs nicotiniques d'insectes, différentes techniques ont été utilisées. L'expression des sous-unités nicotiniques en système hétérologue a permis d'associer des combinaisons en sous-unités nicotiniques formant des récepteurs nicotiniques fonctionnels avec des propriétés pharmacologiques particulières. Bien que cette méthode de caractérisation pharmacologique se soit avérée effective pour les récepteurs nicotiniques de vertébrés, l'expression de sous-unités nicotiniques d'insecte dans un système hétérologue reste difficile (Millar, 1999, 2003, 2009; Millar et Lansdell, 2010). Néanmoins, il est possible de dresser un profil pharmacologique des récepteurs nicotiniques d'insecte en étudiant, entre autres, l'affinité de liaison d'un ligand radiomarqué (Lansdell et Millar 2000) ou par l'application d'agonistes et antagonistes sur des récepteurs nicotiniques chimériques exprimés dans un système hétérologue (Marshall et al, 1990; Matsuda et al, 1998; Sgard et al, 1998; Schulz et al, 2000; Yixi et al, 2009; Li et al, 2010; Lansdell et al, 2012), sur des extraits membranaires (Liu et al, 2005, 2006, 2009) ou bien encore sur des préparations neuronales (Courjaret et Lapied, 2001; Courjaret et al, 2003; Dupuis et al, 2011; Benzidane et al, 2017).

6.1.1. Caractérisation de la pharmacologie des nAChRs en fonction de la combinaison en sous-unités chez la drosophile *Drosophila melanogaster*

Chez les vertébrés, les sous-unités nicotiniques $\alpha 7$, $\alpha 8$ et $\alpha 9$ sont capables de former des récepteurs homopentamériques fonctionnels sensibles à l' α -Bgt (Couturier et al, 1990 ; Cordero-Erausquin et al, 2000). En revanche, les récepteurs hétéropentamériques composés des sous-unités $\alpha 2$ à $\alpha 6$ et $\beta 2$ à $\beta 4$ ne montrent pas de sensibilité pour l' α -bgt (Cordero-Erausquin et al, 2000; Tomizawa et al, 2005). Chez les insectes, il a également été retrouvé des récepteurs nicotiniques capables de s'assembler en homopentamère (Sgard et al, 1998), en hétéropentamère de sous-unités α (Schulz et al, 2000) ou en hétéropentamère de sous-unités α et β (Chamaon et al, 2000, 2002; Li et al, 2010; Sun et al, 2017). L'expression en système hétérologue de sous-unités, α ou β , d'insectes s'est souvent faite de manière conjointe avec des

sous-unités nicotiniques, α ou β , de vertébrés (Millar et Lansdell, 2010). La maturation ainsi que l’adressage à la membrane semblent être les problèmes majeurs rencontrés quant à la formation de récepteurs nicotiniques d’insectes fonctionnels dans un système hétérologue (Millar, 1999; Millar et Lansdell, 2010; Jones et al, 2010; Lansdell et al, 2012; Ihara et al, 2020). L’expression dans un système hétérologue des sous-unités de drosophile allant de $D\alpha 1$ à $D\alpha 4$ n’a pas montré d’assemblage hétéromérique ou homomérique fonctionnel. Néanmoins, leur expression avec des sous-unités β de vertébré ($\beta 2$, $\beta 4$, γ et δ) a permis de mesurer l’affinité de ces récepteurs hybrides pour différentes molécules. On observe alors des disparités dans les affinités de liaison en fonction des sous-unités impliquées (Tableau 3).

Sous-unités testées	Techniques utilisées	Test d’affinité à différentes drogues radiomarquées Absence/Présence ou K_D (nM)				Référence
		[³ H]Epi	[³ H]Met	[³ H]Imi	[¹²⁵ I] α -Bgt	
Dα1/Rβ2	- Expression en ovocyte de Xénope - Affinité de liaison	0,19 ± 0,06	1,7 ± 0,3	34,9 ± 0,9	0,9 ± 0,15	Lansdell et Millar, 2000a
Dα1/Rβ4		+	-	-	+	
Dα2/Rβ2		0,23 ± 0,11	5,5 ± 0,8	20 ± 5	-	
Dα2/Rβ4		+	-	-	-	
Dα3/Rβ2		0,08 ± 0,03	2,5 ± 0,9	8,4 ± 1,2	2,3 ± 0,6	
Dα3/Rβ4		0,08 ± 0,02	-	-	2,9 ± 0,9	
Dα3/Rγ		0,73 ± 0,18	9,14 ± 0,6	-	0,9 ± 0,03	
Dα3/Rδ		15,2 ± 1,8	14,2 ± 2,9	-	1,4 ± 0,1	
Dα4/Rβ2	- Expression en cellules S2 - Affinité de liaison	0,03 ± 0,01				Lansdell et Millar, 2000b

Tableau 3. Tableau non exhaustif de combinaisons de sous-unités nicotiniques de la drosophile *Drosophila melanogaster* et de la pharmacologie associée. Les signes -/+ indiquent l’absence/présence de fixation du ligand radiomarqué pour la combinaison de sous-unités concernées. Lansdell et collègue ont utilisé 90 nM [³H]Epibatidine, 25 nM [³H]Méthylcarbamylcholine, 200 nM [³H]Imidaclopride ou 15 nM [¹²⁵I] α -bungarotoxine pour réaliser les tests d’affinité de liaison sur les sous-unités nicotiniques de drosophile.

Les récepteurs nicotiniques hybrides contenant les sous-unités $D\alpha 1$ ou $D\alpha 3$ présentent un site de fixation à l’ α -Bgt (Lansdell et Millar, 2000a; Lansdell et Millar, 2000b) alors que les récepteurs hybrides contenant les sous-unités $D\alpha 2$ ou $D\alpha 4$ ne montrent pas d’affinité pour cette toxine. Les différents récepteurs nicotiniques ainsi formés présentent des différences dans leurs propriétés pharmacologiques (Lansdell et al, 2012).

Les sous-unités $D\alpha 5$ ou $D\alpha 7$ sont capables de s’assembler en récepteurs homomériques fonctionnels. Ces récepteurs répondent de manière similaire à l’acétylcholine avec des CE_{50} équivalentes, à $8,8 \pm 2,5 \mu M$ et à $6,7 \pm 1,7 \mu M$ respectivement. Néanmoins, pour la même application d’ACh, la réponse maximale du récepteur homomérique $D\alpha 5$ est 2,3 fois plus importante que celle du récepteur homomérique $D\alpha 7$. Il a été rapporté la formation des récepteurs nicotiniques hétéromériques fonctionnels tels que $D\alpha 5/D\alpha 6$ et $D\alpha 5/D\alpha 6/D\alpha 7$. Ils diffèrent également par leur réponse à l’acétylcholine. L’amplitude de la réponse maximale à l’acétylcholine du récepteur $D\alpha 5/D\alpha 6/D\alpha 7$ est 3 fois plus élevée que celle des récepteurs composés des sous-unités $D\alpha 5/D\alpha 6$ ou $D\alpha 5/D\alpha 7$. Il est intéressant de noter que seul

l’assemblage $D\alpha 5/D\alpha 6$ présente un site de fixation à l’ α -Bgt. Ce site de fixation à l’ α -Bgt n’est pas retrouvé pour les autres combinaisons de sous-unités, il semblerait qu’il soit déstabilisé par l’ajout de la sous-unité $D\alpha 7$ (Lansdell et al, 2012). Il est intéressant de remarquer que la CE_{50} de l’acétylcholine peut différer d’un facteur 1000 entre les récepteurs possédant des combinaisons différentes en sous-unités nicotiniques. C’est le cas pour le récepteur $D\alpha 5/D\alpha 6/D\alpha 7$ qui possède une CE_{50} d’environ 13,5 nM (Lansdell et al, 2012) (Tableau 4).

Sous-unité	Techniques utilisées	Acétylcholine (CE_{50} , I_{max} et I_{moy})	[^{125}I] α -Bgt	Référence
$D\alpha 5$	- Expression en ovocytes de Xénope ou en cellules S2 pour les tests d’affinité - Doubles microélectrodes intracellulaires à -60mV	$CE_{50} = 8,8 \pm 2,5 \mu M$ $I_{max} = 200 \text{ nA}$ $I_{moy} = 141 \pm 25 \text{ nA}$	-	Lansdell et al, 2012
$D\alpha 7$		$CE_{50} = 6,7 \pm 1,7 \mu M$ $I_{max} = 86 \text{ nA}$ $I_{moy} = 45 \pm 13 \text{ nA}$	-	
$D\alpha 5 + D\alpha 6$		$CE_{50} = 8,6 \pm 2,4 \mu M$ $I_{max} = 46 \text{ nA}$ $I_{moy} = 20 \pm 8 \text{ nA}$	+	
$D\alpha 5 + D\alpha 7$		$CE_{50} = 1,6 \pm 0,3 \mu M$ $I_{max} = 53 \text{ nA}$ $I_{moy} = 39 \pm 8 \text{ nA}$	-	
$D\alpha 5 + D\alpha 6 + D\alpha 7$		$CE_{50} = 13,5 \pm 1,7 \text{ nM}$ $I_{max} = 150 \text{ nA}$ $I_{moy} = 107 \pm 12 \text{ nA}$	-	

Tableau 4. Tableau non exhaustif de combinaisons de sous-unités nicotiniques de la drosophile *Drosophila melanogaster* et des réponses associées. Les signes -/+ indiquent l’absence/présence de fixation de [^{125}I] α -bungarotoxine radiomarquée pour la combinaison de sous-unités concernées.

6.1.2. Caractérisation de la pharmacologie des nAChRs en fonction de la combinaison en sous-unités chez le puceron vert du pêcher *Myzus persicae*

De la même façon que pour la drosophile, la co-expression avec la sous-unité $\beta 2$ de rat ($R\beta 2$) a permis de mettre en évidence la pharmacologie particulière des sous-unités nicotiniques $Mp\alpha 1$, $Mp\alpha 2$, $Mp\alpha 3$ et $Mp\alpha 4$ du puceron *Myzus Persicae*. Les premières sous-unités nicotiniques identifiées chez le puceron *Myzus Persicae* sont $Mp\alpha 1$ et $Mp\alpha 2$ (Sgard et al, 1998). L’expression de ces sous-unités dans l’ovocyte de xénope en présence ou non de la sous-unité $\beta 2$ de rat a permis d’enregistrer l’activité de récepteurs nicotiniques fonctionnels. Cependant, peu d’ovocytes exprimaient ces récepteurs et l’amplitude des courants enregistrés suite à l’application d’acétylcholine ou de nicotine était relativement faible (Sgard et al, 1998). Huang et ses collaborateurs ont entrepris l’expression de ces sous-unités ainsi que celle des sous-unités $Mp\alpha 3$, $Mp\alpha 4$ et $Mp\beta 1$ dans les cellules S2 de drosophile (Huang et al, 1999, 2000). Les récepteurs $Mp\alpha 2 + R\beta 2$ et $Mp\alpha 3 + R\beta 2$ montrent une forte affinité pour l’Imidaclopride alors que les récepteurs $Mp\alpha 1 + R\beta 2$ et $Mp\alpha 4 + R\beta 2$ ne semblent pas capables de fixer ce ligand radiomarqué. De plus, le récepteur $Mp\alpha 4 + R\beta 2$ ne présente pas de sites de fixation pour l’Imidaclopride et l’épipatidine radiomarqué laissant supposer une insensibilité de ce récepteur pour ces 2 agonistes (Huang et

al, 1999, 2000) (Tableau 5). L'immunoprécipitation de la sous-unité $Mp\beta 1$ a permis de mettre en évidence son assemblage avec les sous-unités $Mp\alpha 1$ et $Mp\alpha 2$ mais pas avec les sous-unités $Mp\alpha 3$ et $Mp\alpha 4$.

Combinaison en sous-unité	Techniques utilisées	Résultats		Référence
$Mp\alpha 1 + Mp\beta 1$	- Expression en cellules S2 - Co-immunoprécipitation	Co-assemblage observé pour ces sous-unités.		Huang et al, 2000
$Mp\alpha 2 + Mp\beta 1$				
$R\alpha 4 + Mp\beta 1$				
		Test d'affinité Absence/Présence ou K_D (nM)		Huang et al, 1999, 2000
		[³H]Epi	[³H]Imi	
$Mp\alpha 1 + R\beta 2$	- Expression en cellules S2 - Affinité de liaison	+	-	Sgard et al, 1998
$Mp\alpha 2 + R\beta 2$		+	$3 \pm 0,5$	
$Mp\alpha 3 + R\beta 2$		+	$2,8 \pm 0,1$	
$Mp\alpha 4 + R\beta 2$		-	-	
		Courant induit par l'application d'agonistes		Sgard et al, 1998
		Acétylcholine (100 μM)	Nicotine (10 μM)	
$Mp\alpha 1$ (homomère) sensible α-Bgt	- Expression en ovocyte de Xénope. - Doubles microélectrodes intracellulaires à -60mV et -50mV	$CE_{50} = 40 \mu$M $I_{max} = 40$ nA $I_{max} = 40$ nA	$CE_{50} = 0,5 \mu$M $I_{max} = 32$ nA $I_{moy} = 17 \pm 6$ nA $I_{max} = 40$ nA	
$Mp\alpha 2$ (homomère) insensible α-Bgt		$I_{max} < 10$ nA $CE_{50} = N.C$	$I_{max} < 10$ nA $I_{moy} = 7,5 \pm 1$ nA $CE_{50} = N.C$	

Tableau 5. Tableau non exhaustif de combinaisons de sous-unités nicotiniques du puceron *Myzus persicae* et de la pharmacologie associée. Les signes + correspondent à la liaison de l'épiibatidine radiomarquée avec un K_D très faible ($K_D < 0,1$ nM) selon les auteurs (Huang et al, 2000). Les signes - correspondent à une absence de fixation du ligand Imidaclopride radiomarqué. N.C : non communiqué

6.1.3. Caractérisation de la pharmacologie des nAChRs en fonction de la combinaison en sous-unités chez la cicadelle brune *Nilaparvata lugens*

À ce jour, 4 sous-unités α ($Nl\alpha 1$, $Nl\alpha 2$, $Nl\alpha 3$, $Nl\alpha 8$) et une sous-unité β ($Nl\beta 1$) ont été étudiées chez la cicadelle brune *Nilaparvata lugens*. La co-expression dans un système hétérologue des sous-unités α avec la sous-unité nicotinique $\beta 2$ de rat a permis de déterminer le profil pharmacologique de ces récepteurs. Il a été rapporté l'assemblage de plusieurs récepteurs nicotiniques fonctionnels avec les sous-unités nicotiniques $Nl\alpha 1$ et $Nl\alpha 2$. Les récepteurs $Nl\alpha 1/R\beta 2$ et $Nl\alpha 2/R\beta 2$ diffèrent légèrement par leur sensibilité à l'ACh avec des CE_{50} respectives de $37 \pm 6 \mu$ M et $62 \pm 10 \mu$ M. Cette différence de sensibilité est nettement plus marquée en ce qui concerne l'Imidaclopride. En effet, le récepteur $Nl\alpha 1/R\beta 2$ possède une CE_{50} de $61 \pm 7 \mu$ M alors que le récepteur $Nl\alpha/R\beta 2$ est 14,2 fois moins sensible à l'Imidaclopride avec une CE_{50} de $870 \pm 76 \mu$ M. Pour le récepteur composé des sous-unités $Nl\alpha 1/Nl\alpha 2/R\beta 2$, on observe une CE_{50} de 54μ M à l'ACh, soit une sensibilité à l'ACh comprise entre celles obtenues pour les récepteurs $Nl\alpha 1/R\beta 2$ et $Nl\alpha 2/R\beta 2$. En ce qui concerne l'Imidaclopride, on retrouve une sensibilité comprise

entre celles de $Nl\alpha 1/R\beta 2$ et $Nl\alpha 2/R\beta 2$ avec une CE_{50} de $350 \pm 41 \mu M$ pour $Nl\alpha 1/Nl\alpha 2/R\beta 2$. La sous-unité nicotinique $Nl\alpha 2$ participerait donc à une diminution de la sensibilité à l'Imidaclopride (Liu et al, 2009). Il est intéressant de comparer cette valeur avec celle obtenue pour le récepteur $Nl\alpha 3/Nl\alpha 8/R\beta 2$. La réponse de ce récepteur nicotinique présente une CE_{50} de $3,2 \pm 0,5 \mu M$ à l'Imidaclopride, soit une sensibilité 109 fois plus importante pour ce récepteur comparé au récepteur $Nl\alpha 1/Nl\alpha 2/R\beta 2$ (Zhang et al, 2009). Cependant, l'expression dans un système hétérologue ne permet pas d'établir la composition des récepteurs natifs. En effet, il est indispensable de déterminer si ces sous-unités sont colocalisées ou bien encore impliquées dans la formation d'un même récepteur. Li et ses collaborateurs (Li et al, 2010) ont découvert, sur des extraits membranaires, deux récepteurs hétéropentamériques impliquant 4 sous-unités α différentes ($Nl\alpha 1$, $Nl\alpha 2$, $Nl\alpha 3$ et $Nl\alpha 8$) et une sous-unité β ($Nl\beta 1$). Ces 2 récepteurs, dont la composition fut déterminée par co-immunoprécipitation, possèdent 2 affinités pour l'Imidaclopride très différentes. La co-précipitation des sous-unités $Nl\alpha 1/Nl\alpha 2/Nl\beta 1$ indique l'existence d'un récepteur constitué de ces sous-unités possédant une faible affinité pour l'Imidaclopride avec une constante de dissociation K_D de 1,5 nM (Tableau 5). De plus, un autre sous-type de récepteur composé des sous-unités $Nl\alpha 3/Nl\alpha 8/Nl\beta 1$ a été identifié par immunoprécipitation. Ce dernier possède une affinité plus importante pour l'Imidaclopride avec un K_D de 3,5 pM, soit 428 fois plus affin que le récepteur $Nl\alpha 1/Nl\alpha 2/Nl\beta 1$ (Li et al, 2010). La différence d'affinité pour l'Imidaclopride entre ces deux récepteurs nicotiniques proviendrait majoritairement de l'implication de la sous-unité nicotinique $Nl\alpha 8$. En effet, il a été montré que la formation d'un récepteur nicotinique fonctionnel composé des sous-unités $Nl\alpha 8/R\beta 2$ produisait une réponse maximale à l'acétylcholine et à l'Imidaclopride relativement faible comparée aux résultats précédents, soit environ 17 nA et 11,6 nA respectivement. De même, la sensibilité de ce récepteur à l'acétylcholine et à l'Imidaclopride se caractérise par une CE_{50} d'environ 63 μM et 66,6 μM respectivement (Guo et al, 2015). L'implication de la sous-unité $Nl\alpha 8$ dans la sensibilité à l'Imidaclopride a été montrée lorsque le niveau d'expression de celle-ci fut quantifié dans une population de cicadelles *N. lugens* sélectionnée sur plusieurs générations avec de l'Imidaclopride. Plus la population de cicadelles *N. lugens* se trouvait résistante, plus l'expression de $Nl\alpha 8$ était diminuée (Zhang et al, 2015). L'utilisation d'ARN interférent ciblant la sous-unité $Nl\alpha 8$ a permis de confirmer ce résultat. En effet, une diminution de 60% et 75% de l'expression de la sous-unité $Nl\alpha 8$ induite par une double injection d'ARN interférent était corrélée avec une diminution de la mortalité observée de 40% et 60%, respectivement. De manière intéressante, l'injection de quantité variable d'ARNc codant pour $Nl\alpha 8$ avec une quantité fixe de la sous-unité $R\beta 2$ dans des ovocytes de xénope a montré que les courants induits par l'application d'Imidaclopride étaient les plus faibles pour les quantités d'ARNc/ $Nl\alpha 8$ les plus faibles (Zhang et al, 2015).

Combinaison en sous-unités	Technique utilisée	Molécules utilisées	Réponse (CE_{50} et I_{max}) Affinité (K_D en nM)	Référence
Natif Nα1/Nα2/Nβ1	- Co-immunoprécipitation - Affinité de liaison	[3H]Imi	Faible affinité : $K_D = 1,5 \pm 0,2$ nM	Li et al, 2010
Natif Nα3/Nα8/Nβ1			Haute affinité : $K_D = 3,5 \pm 0,6$ pM	
Recombiné Nα1/Nα2/Rβ2 Ratio de 1 : 1 : 1	- Expression en ovocytes de Xénopes - Doubles microélectrodes intracellulaires à -70mV	Acétylcholine	$CE_{50} = 54 \pm 6$ μ M $I_{max} = 250 \pm 19$ nA	Liu et al, 2009
Recombiné Nα1/NIRβ2 Ratio de 1 : 1		Imidaclopride	$CE_{50} = 350 \pm 27$ μ M $I_{max} = 128 \pm 18$ nA	
		Acétylcholine	$CE_{50} = 37 \pm 6$ μ M $I_{max} = 237 \pm 23$ nA	
Recombiné Nα2/NIRβ2 Ratio de 1 : 1		Imidaclopride	$CE_{50} = 61 \pm 7$ μ M $I_{max} = 161 \pm 15$ nA	
		Acétylcholine	$CE_{50} = 62 \pm 10$ μ M $I_{max} = 269 \pm 32$ nA	
Recombiné Nα3/Nα8/Rβ2		Imidaclopride	$CE_{50} = 870 \pm 76$ μ M $I_{max} = 201 \pm 28$ nA	
	Acétylcholine	$CE_{50} = 17,6 \pm 3,7$ μ M $I_{max} = 349,6 \pm 45,2$ nA	Zhang et al, 2009	
Recombiné Nα8/Rβ2	Imidaclopride	$CE_{50} = 3,2 \pm 0,5$ μ M $I_{max} = 288,4 \pm 31,6$ nA	Guo et al, 2015	
	Acétylcholine	$CE_{50} \sim 63$ μ M $I_{max} \sim 17$ nA		
Recombiné Nα8/Rβ2	Imidaclopride	$CE_{50} = 66,59 \pm 8,33$ μ M $I_{max} = 11,56 \pm 2,27$ nA		
	Acétylcholine	$CE_{50} \sim 63$ μ M $I_{max} \sim 17$ nA		

Tableau 6. Tableau résumant les résultats obtenus sur des récepteurs nicotiniques recombinés de cicadelle *N. lugens*.

6.1.4. Caractérisation de la pharmacologie des nAChRs en fonction de la combinaison en sous-unités chez la blatte *Periplaneta americana*

Ce n'est que très récemment que des sous-unités nicotiniques de blattes ont pu être caractérisées comme formant un récepteur nicotinique homomérique fonctionnel en système hétérologue. La sous-unité Pa α 7 a montré une capacité d'assemblage en un récepteur homopentamérique fonctionnel capable de répondre à l'acétylcholine et à la nicotine (Cartereau et al, 2020) (Tableau 7).

Combinaison en sous-unités	Technique utilisée	Molécules utilisées	Réponse (CE_{50} et I_{max}) Affinité (K_D en nM)	Référence
Homomérique Paα7	- Expression en ovocytes de Xénopes - Doubles microélectrodes intracellulaires à -80mV	Acétylcholine	$CE_{50} =$ N.D $I_{max} = 56 \pm 9$ nA	Cartereau et al, 2020
		Nicotine	$CE_{50} = 790$ μ M $I_{max} = 212 \pm 0,13$ nA	

Tableau 7. Tableau résumant les résultats obtenus lors de l'expression en système hétérologue de récepteurs nicotiniques de *Periplaneta americana*. N.D : non déterminé.

L'application de différentes drogues a montré que le récepteur nicotinique homomérique Pa α 7 était insensible aux antagonistes tels que l' α -Bgt, la δ -tubocurarine et à la mécamylamine. L'application de 10 mM d'agonistes, tels que la nicotine et l'acétylcholine, a permis l'observation d'un courant d'une amplitude de 212 nA et de 56nA, respectivement. Le courant nicotinique est

sensible à la méthyllycaconitine, on observe une diminution d’environ 24% lors de l’application de cet antagoniste (Cartereau et al, 2020).

Les résultats obtenus sur des récepteurs exprimés en système hétérologue permettent d’affiner nos connaissances sur la pharmacologie des récepteurs nicotiniques. De plus, les données issues de co-immunoprécipitations de récepteurs natifs chez la cicadelle brune *Nilaparvata lugens* ou l’utilisation d’ARN interférent permettent de mettre en évidence le rôle majeur que peuvent avoir les sous-unités nicotiniques dans la modification des propriétés pharmacologiques des récepteurs nicotiniques d’insectes. Néanmoins, d’autres facteurs peuvent être impliqués dans la modulation de l’activité et de la sensibilité des récepteurs nicotiniques.

6.2. Mécanismes de régulation des récepteurs nicotiniques

Les mécanismes de régulation des récepteurs nicotiniques font l’objet de nombreuses études. Ces études ont pour but de développer de nouvelles stratégies de traitement dans le cas de pathologie humaine ou, dans le contexte de ces travaux de thèse, d’optimiser l’effet d’un insecticide afin de lutter plus efficacement contre les ravageurs de culture. Les différents mécanismes de régulation abordés seront principalement orientés et illustrés pour notre modèle biologique : la blatte *Periplaneta americana*.

6.2.1. Modulation allostérique

Jusqu’ici, nous avons abordé les récepteurs nicotiniques comme étant des structures multimoléculaires répondant à différentes drogues en fonction des sous-unités qui les constituent. La sensibilité du récepteur aux différentes drogues peut dépendre également d’éléments extérieurs à la structure moléculaire du récepteur. Les récepteurs nicotiniques ont pu être décrits comme des protéines présentant des interactions allostériques entre ses différents composants et ses ligands. Chez les insectes, la modulation allostérique peut faire intervenir des molécules considérées comme des modulateurs allostériques positifs de nAChRs, appelée également PAM pour « positive allosteric modulator » (Bertrand et Gopalakrishnan, 2007) parmi lesquels on trouve des insecticides ciblant les nAChRs tels que la Spinosyn A (Salgado et Saar, 2004; Salgado, 2016) ou des toxines d’araignée telles que la κ -HXTX-Hv1c (Windley et al, 2017). Les PAM peuvent être de type I, c’est le cas de la Spinosyn A. Ces molécules augmentent l’amplitude du courant lié à l’activation du nAChR sans influencer l’état de désensibilisation du récepteur. Les PAM de type II, comme la toxine d’araignée, vont augmenter la réponse à un agoniste en diminuant le nombre de nAChRs qui se désensibilisent après l’activation par l’agoniste. À l’inverse, il existe des modulateurs allostériques négatifs, ou NAM pour « negative allosteric modulator », plus classiquement appelés antagonistes non compétitifs. Ces molécules n’empêchent pas la fixation du ligand, mais agiront plus spécifiquement sur les cinétiques d’ouverture du récepteur, c’est-à-dire en ralentissant la vitesse et/ou le temps d’ouverture du canal ionique, ou sur le canal ionique lui-même en bloquant directement le flux d’ions (Chatzidaki et Millar, 2015). Enfin, il est possible d’avoir des

modulateurs allostériques silencieux, ou SAM pour « silence allosteric modulator ». Ces derniers n’induiront pas d’augmentation ou de diminution de la réponse des nAChRs à un agoniste orthostérique. Leur action nécessite leur présence simultanée avec les PAMs et les NAMs. En effet, ils interagissent avec le même site allostérique que celui des PAMs ou des NAMs. Ils agiront donc indirectement sur la réponse des nAChRs en modifiant l’effet de modulation allostérique positif des PAMs ou celui négatif des NAMs (Gill-Thind et al, 2015).

Les modifications de conformation liées à la structure du récepteur qui sont induites par la fixation de ligands, peuvent aboutir à des phénomènes d’inhibition ou d’activation du récepteur nicotinique (Changeux, 2018). Ces changements d’état provoquent une altération des affinités du récepteur pour ses agonistes et antagonistes. Les récepteurs nicotiques peuvent être décrits selon 4 états de conformation (Figure 6). L’état activable au repos (R) correspond à un récepteur fermé en attente de liaison avec son ligand. La liaison d’un agoniste déclenche l’activation et l’ouverture du canal ionique (A). Suite à son activation, le récepteur nicotinique passe dans un état intermédiaire transitoire insensible à une activation (I) pendant lequel s’effectue la dissociation de l’agoniste (Edelstein et al, 1996). Après activation, le récepteur peut être dans un état final « désensibilisé » (D) réfractaire à toute réactivation. Cet état est stabilisé en présence d’agoniste. Depuis cette conformation, le retour à l’état de repos (R) peut nécessiter quelques secondes voire plusieurs minutes (Lena et Changeux, 1993; Changeux, 2018) (Figure 6).

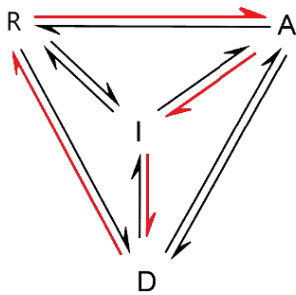


Figure 6. Représentation schématique des changements de conformation adoptés par le récepteur nicotinique. En rouge est représentée la dynamique décrite dans le texte selon la cinétique $R \rightarrow A \rightarrow I \rightarrow D \rightarrow R$. Les flèches noires représentent des changements de conformations probables, mais non favorisés. Modifiée d’après Edelstein et al, 1996.

Ce type de modulation a pu être démontré, par exemple sur les récepteurs nAChN et nAChD décrits par Salgado et ses collaborateurs chez la blatte *Periplaneta americana* (Salgado et Saar, 2004; Salgado, 2016). La désensibilisation à l’acétylcholine des récepteurs nAChD ne se fait pas de manière homogène. En effet, certains neurones expriment des populations de nAChD présentant une désensibilisation très rapide, laissant alors rapidement la réponse globale à l’acétylcholine dépendre des récepteurs nAChN (Figure 7A) alors que d’autres neurones présentent des nAChD se désensibilisant plus lentement (Figure 7B).

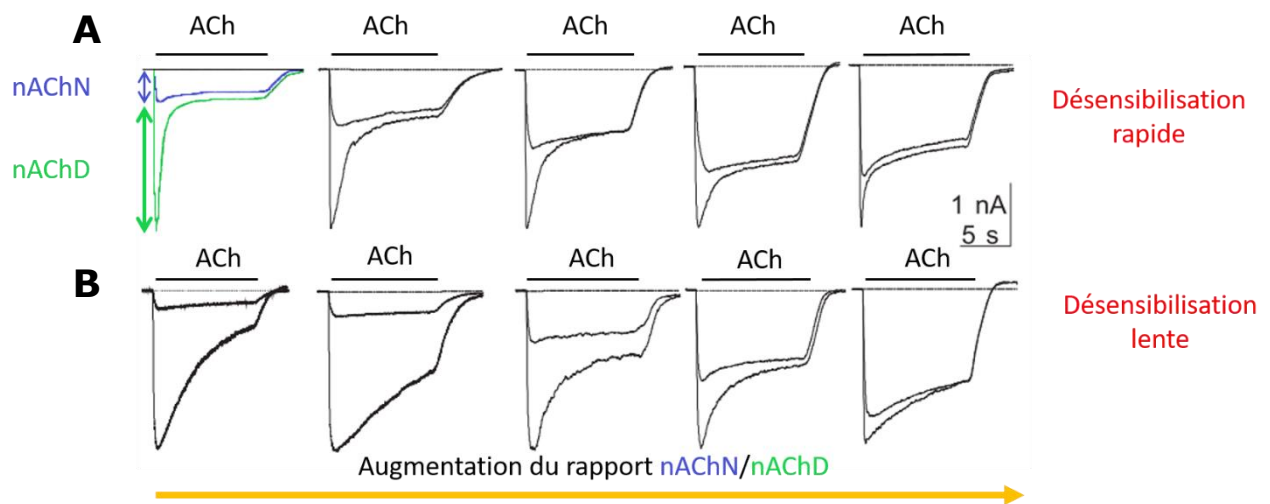


Figure 7. Exemples de courants induits par l’application d’acétylcholine pendant 10 secondes sur 10 neurones différents. Ces mesures ont été faites avant (courbe verte en exemple) et après (courbe bleue en exemple) la désensibilisation des nAChD par l’application de 100 nM d’Imidaclopride. A) Neurones présentant des récepteurs nAChN et nAChD en proportion variable et pour lesquels les récepteurs nAChD se désensibilisent rapidement suite à l’application d’acétylcholine. B) Neurones présentant des récepteurs nAChN et nAChD en proportion variable et pour lesquels les récepteurs nAChD se désensibilisent lentement suite à l’application d’acétylcholine. Modifiée d’après Salgado et Saar, 2004.

Ces variations pourraient être expliquées par la présence de plusieurs sous-types de récepteurs nicotiniques se désensibilisant en présence d’Imidaclopride. En effet, les enregistrements des vitesses de désensibilisation ont permis de catégoriser ces courants selon 3 constantes de temps de désensibilisation. Cette catégorisation dans les vitesses de désensibilisation laisserait suggérer l’existence de plusieurs sous-types de récepteur nAChD. Or, les réponses pharmacologiques obtenues tout au long de l’étude ne permettent pas d’isoler spécifiquement ces potentiels sous-types de récepteurs nAChD. Selon les auteurs, ces observations indiqueraient qu’il n’y aurait pas plusieurs sous-types de récepteurs se désensibilisant, mais plutôt un seul type de nAChD possédant 3 états de désensibilisation (Salgado et Saar, 2004) (Figure 8).

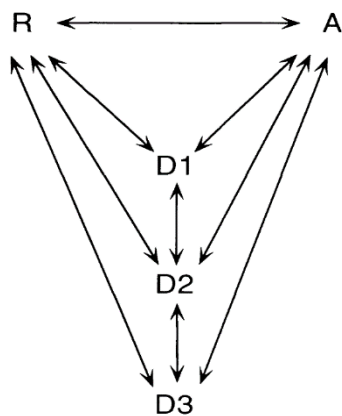


Figure 8. Représentation schématique d’un récepteur nicotinique de type nAChD ayant plusieurs états de conformation. La lettre R correspond à l’état de repos et activable du récepteur nicotinique, la lettre A au récepteur nicotinique activé et les différents états de désensibilisation correspondent aux lettres D (D1, D2 et D3). Modifiée d’après Lena et Changeux, 1993.

L’avantage de ces 3 états de désensibilisation est qu’ils peuvent expliquer les différences observées dans les vitesses de désensibilisation tout en conservant une pharmacologie propre à un seul type de récepteur nAChD. Ces observations ont été faites en présence d’atropine (1 μ M), un antagoniste des récepteurs muscariniques. Or, en présence d’atropine, les réponses des nAChD et nAChN induites par l’application d’acétylcholine (100 μ M) se retrouvent très variables, que cela soit par l’amplitude de courant enregistré ou par la vitesse de désensibilisation des récepteurs nAChD. Il est alors possible que ce phénomène de désensibilisation soit modulé par les récepteurs muscariniques *via* la phosphorylation de sites allostériques intracellulaires des nAChDs (Lena et Changeux, 1993; Salgado et Saar, 2004).

6.2.2. Régulation des récepteurs nicotiniques par les protéines auxiliaires

Les récepteurs nicotiniques permettent la transmission d’un message chimique extracellulaire en un message électrique intracellulaire. Ils évoluent donc en interaction avec des éléments intra et extracellulaires. Or, il a été montré que des protéines étaient capables d’interagir directement avec les nAChRs. Il s’est avéré que l’interaction de certaines protéines avec les nAChRs participait à une large gamme de fonctions telles que la maturation, l’adressage à la membrane, la modulation de la sensibilité et d’amplitude de réponse des nAChRs vis-à-vis d’agonistes. Chez les vertébrés, il est possible de dresser une liste de protéines participant à la régulation des nAChRs avec la détermination précise de leur rôle ainsi que la sous-unité nicotinique avec laquelle elles peuvent interagir (Jones et al, 2010). Chez les invertébrés, on peut citer en exemple la protéine chaperonne RIC-3 qui participe au repliement et à l’assemblage des récepteurs nicotiniques dans le réticulum endoplasmique (Crespi et al, 2018). Elle est couramment utilisée lors d’expression de sous-unités nicotiniques d’insectes en système hétérologue afin d’obtenir des assemblages fonctionnels de nAChRs capables de répondre à l’application d’agonistes (Lansdell et al, 2005; Millar, 2008; Lansdell et al, 2012; Millar et Lansdell, 2010). L’augmentation de l’effet agoniste de certains ligands, tels que l’acétylcholine et l’Imidaclopride, a pu être observée lorsque les sous-unités $Nl\alpha$ et $\beta 2$ étaient coexprimées avec les protéines auxiliaires Lynx1 et Lynx2 en ovocytes de xénopes. De plus, la co-expression de ces protéines a permis d’augmenter la réponse à l’Imidaclopride du récepteur nicotinique composé des sous-unités mutées $Nl\alpha 1^{Y151S}/\beta 2$ alors que la mutation Y151S induit, initialement, une résistance à l’Imidaclopride (Liu et al, 2009). Plus récemment, il a été montré qu’une protéine transmembranaire reliée à la thiorédoxine (TMX3) avait une importance capitale dans la formation de récepteurs hétéromériques fonctionnels composés des sous-unités de la drosophile $D\alpha 1/D\beta 1$, $D\alpha 1/D\alpha 2/D\beta 1$, $D\alpha 1/D\beta 1/D\beta 2$ et $D\alpha 1/D\alpha 2/D\beta 1/D\beta 2$ (Ihara et al, 2020). Grâce à la protéine auxiliaire TMX3, il a été possible d’observer la formation de récepteurs nicotiniques fonctionnels composés des sous-unités d’abeille $Amel\alpha 1/Amel\alpha 8/Amel\beta 1$ et $Amel\alpha 1/Amel\alpha 2/Amel\alpha 8/Amel\beta 1$ ainsi que pour le bourdon des récepteurs composés de $Bt\alpha 1/Bt\alpha 8/Bt\beta 1$ et $Bt\alpha 1/Bt\alpha 2/Bt\alpha 8/Bt\beta 1$ (Ihara et al, 2020). Cela a permis d’enregistrer pour la première fois dans un système hétérologue des courants induits par l’application d’insecticides

de la famille des néonicotinoïdes pour ces deux espèces pollinisatrices. La caractérisation du rôle des protéines auxiliaires de nAChRs chez les insectes pourrait être un nouvel élément à prendre en compte dans la lutte contre les ravageurs de cultures.

6.2.3. Régulation des récepteurs nicotiniques par les voies de signalisation intracellulaire

Parmi les voies de signalisation intracellulaire modulant l'activité des nAChRs, les plus étudiées mettent en jeu les phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation *via* l'activité de kinases et de phosphatases, respectivement. Les kinases potentiellement impliquées ont été identifiées par la présence de sites spécifiques de phosphorylation, présents principalement dans la longue boucle intracellulaire reliant les domaines transmembranaires M3 et M4. Chez l'abeille domestique *Apis mellifera*, le moustique *Anopheles gambiae* et la drosophile *Drosophila melanogaster* (Grauso et al, 2002; Jones et al, 2006; Jones et Sattelle, 2007; Thany et al, 2007), il a été trouvé dans la séquence protéique des sous-unités nicotiniques des motifs potentiels de phosphorylation par des kinases dépendantes de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), des kinases C (PKC), la caséine kinase de type 2 (CK2) et des tyrosines kinases. De plus, nous avons pu voir précédemment (Tableau 5) que des récepteurs de motoneurone de blatte sensibles à l' α -Bgt pouvaient être inhibés, entre autres, par l'application de 5-hydroxytryptamine (5-HT). En 2002, Butt et Pitman (Butt et Pitman, 2002) suggèrent que cette régulation atypique se ferait par l'intermédiaire de protéines G. En effet, l'inhibition de l'adénylate cyclase par le didéoxyadénosine a pour conséquence la réduction de l'effet modulateur du 5-HT sur la réponse à l'acétylcholine, alors que des analogues de l'AMPC intracellulaire semblent imiter l'effet du 5-HT sur les récepteurs nicotiniques. De même, l'ajout d'un analogue du GMPC, le 8-bromo cGMP, entraîne une diminution des courants induits par l'application d'acétylcholine (Butt et Pitman, 2005). Ceci démontre que, dans ce contexte, la modulation du récepteur nicotinique se fait *via* les voies de signalisation intracellulaire dépendantes de seconds messagers que sont les voies de signalisation impliquant la PKA (AMPC dépendant) et la PKG (GMPC dépendant). L'activation des voies de signalisation régulant les récepteurs nicotiniques se fait par l'intermédiaire de seconds messagers. Ces derniers peuvent être de natures diverses et peuvent prendre la forme d'un ion présent dans le cytoplasme tel que le Ca^{2+} , une monoamine cyclique telle que l'AMPC et le GMPC, de molécules plus complexes comme l'inositol triphosphate (IP3) ou le diacylglycérol (DAG) (Figure 9).

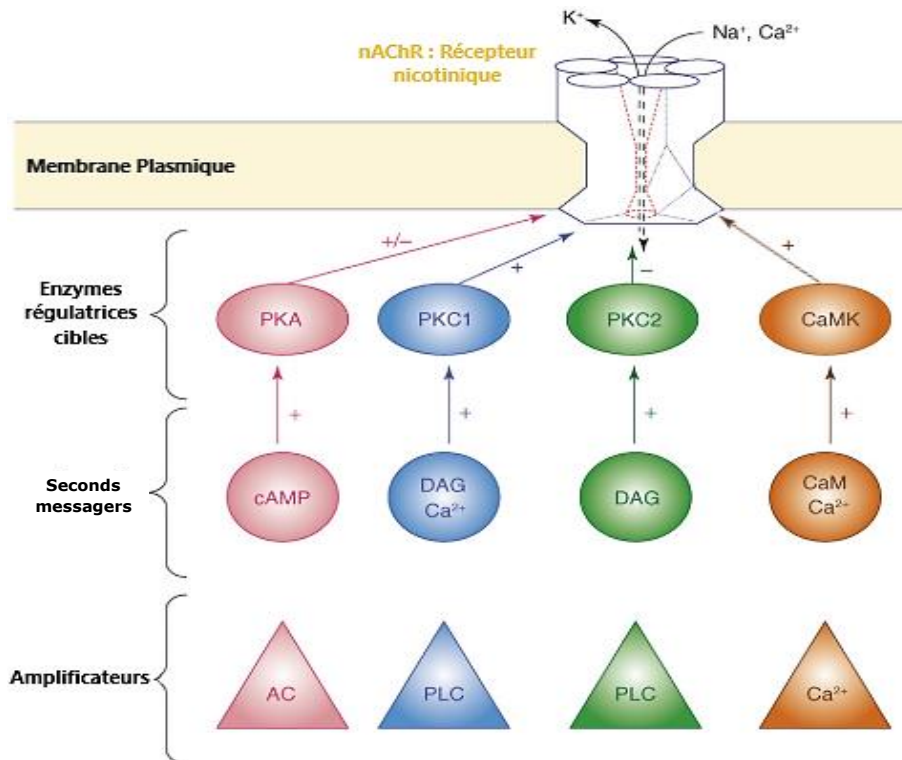


Figure 9. Schéma regroupant les différentes voies de signalisations régulant l'activité des récepteurs nicotiniques. Modifiée d'après Thany et al, 2007.

Il est possible d'illustrer le rôle des seconds messagers ainsi que des enzymes de phosphorylation et de déphosphorylation en prenant en exemple la régulation des récepteurs nAChR1 et nAChR2 caractérisés chez la blatte *Periplaneta americana* (Courjaret et Lapied, 2001).

a) Étude de la régulation des récepteurs de sous-type nAChR1

L'étude des voies de signalisation impliquées dans la régulation de nAChR1 a mis en évidence l'implication de nombreux acteurs moléculaires (Courjaret et Lapied, 2001; Courjaret et al, 2003). Les études réalisées grâce à la technique de patch-clamp sur les neurones DUM de la blatte ont montré qu'une faible concentration d'AMPC augmentait le courant induit par l'application de 10 mM de nicotine passant par nAChR1. L'ajout d'une faible concentration d'AMPC (0,1 mM) dans le milieu intracellulaire augmente de 100% les courants en réponse à l'application de nicotine (10 mM). L'effet activateur de l'AMPC sur la réponse nicotinique de nAChR1 a pu être aboli par un inhibiteur de la PKA, démontrant l'implication directe de cette enzyme. Néanmoins, à plus forte concentration intracellulaire d'AMPC (0,3 mM et 1 mM), une diminution du courant nicotinique a été observée, indiquant alors un autre mécanisme de régulation du nAChR1. Il s'agirait d'une régulation indirecte du nAChR1 *via* la modification de l'activité enzymatique de phosphatases de type 1 (PP1) et 2A induite par la PKA (Figure 10). Il a été montré chez la souris que la phosphorylation de ces 2 phosphatases par la PKA augmente l'activité phosphorylase de la PP1 et 2A (Usui et al, 1998; Ahn et al, 2007). L'état de phosphorylation du récepteur nAChR1 a donc été étudié afin de comprendre son impact sur la réponse nicotinique. Il s'est avéré que l'utilisation de l'acide okadaïque, un inhibiteur puissant de la phosphatase PP1/2A (Herzig et

Neumann, 2000; Garcia et al, 2003) bloquait l'effet répresseur observé aux fortes concentrations d'AMPc (0,3 mM et 1 mM). Ceci indique que la phosphatase PP1/2A joue, elle aussi, un rôle important dans la régulation du nAChR1 (Courjaret et Lapied, 2001; Thany et al, 2007). De plus, il a été montré que le calcium pouvait influencer directement ou indirectement l'activité des phosphatases et des kinases, comme c'est le cas des Sérines/Thréonines kinases dépendantes de la concentration en calcium intracellulaire ou de la CaMKII (Herzig et Neumann, 2000). Le blocage de la CaMKII, par le KN-62, a pour effet une forte diminution de la réponse nicotinique liée à l'activation du nAChR1 montrant une régulation directe de la CaMKII sur le nAChR1. Cette première description des voies de signalisation impactant la réponse de nAChR1 à un agoniste tel que la nicotine (Courjaret et Lapied, 2001) a été complétée par la découverte de l'implication de deux autres éléments de régulation. Les protéines kinase de type C, plus précisément les isozymes PKC1 et PKC2, participent, elles aussi, à la régulation du nAChR1. Ces deux enzymes ont un rôle antagoniste dans la régulation du nAChR1 (Courjaret et al, 2003). La PKC1 est dépendante de la concentration en calcium intracellulaire et augmente le courant nicotinique lié à l'activation de nAChR1. La régulation de la PKC1 impliquerait des mécanismes calcium dépendants impliquant directement ou indirectement la phosphatase de type 2B (PP2B) (Courjaret et Lapied, 2001). La PKC2, elle aussi sensible au calcium, et qui inhibe nAChR1, semble plus particulièrement dépendante du diacylglycérol (DAG) qui est un second messenger des voies de signalisation déclenchées par l'activation de récepteur muscarinique. Les voies de signalisation issues de l'activation du récepteur muscarinique de type M1 impliquent la phospholipase de type C (PLC). Cette dernière va alors hydrolyser le phosphatidylinositol 4,5 biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP₃). Ces 2 molécules jouent le rôle de seconds messagers. L'IP₃ présent dans le cytoplasme va se fixer sur les récepteurs à l'IP₃ et entraîner un relargage important des stocks intracellulaires de calcium contenu dans le réticulum endoplasmique (Prole et Taylor, 2019). Quant au diacylglycérol (DAG), celui-ci active les protéines kinase C de type 1 et 2 (PKC1 et PKC2) (Bodereau-Dubois 2011). Le DAG possède un effet activateur sur la PKC2, conduisant alors à une inhibition du récepteur nAChR1. Ceci a pu être confirmé par l'utilisation du DiC8, un analogue du DAG. La présence de DiC8 diminue le courant induit par la nicotine sur nAChR1. Les régulations de nAChR1 sont représentées schématiquement (Figure 10) afin d'avoir un aperçu global de la régulation complexe de ce récepteur nicotinique.

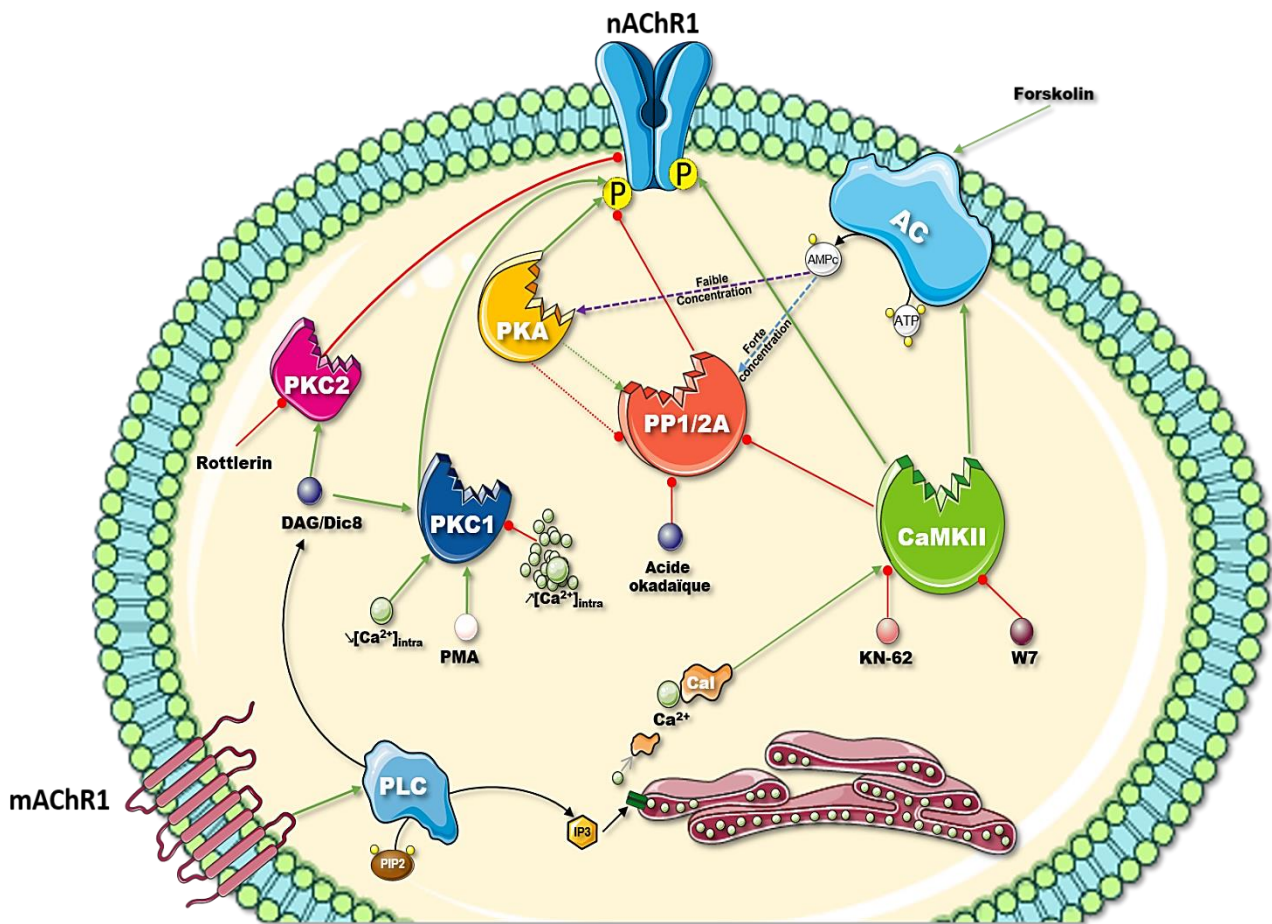


Figure 10. Schéma récapitulatif des voies de signalisation impliquées dans la régulation de nAChR1. Respectivement, les flèches vertes, ou rouges, sont les voies ou molécules allant activer, ou inhiber, les différents éléments cellulaires. Les abréviations utilisées sont : AC = Adénylate Cyclase ; PP1/2A = Phosphatase de type 1 ou 2A ; PKA = protéine kinase A ; PKC1/2 = protéine kinase C de type 1 ou 2 ; PLC = Phospholipase C ; $[Ca^{2+}]_{intra}$ = Concentration en calcium intracellulaire ; Cal = Calmoduline ; CaMKII = protéine kinase Sérine/Thréonine dépendante du complexe Ca^{2+} /Calmoduline ; IP3 = Inositol triphosphate ; PIP2 = Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate ; AMPc = Adénosine Monophosphate ; ATP = Adénosine Triphosphate ; DAG = Diacylglycérol ; Dic8 = 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol ; PMA = phorbol 12 myristate 13 acetate ; W7 = N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide ; KN-62 = 1-[N,O-Bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-méthyl-L-tyrosil]-4-phenylpiperazine.

b) Étude de la régulation des récepteurs de sous-type nAChR2

Il s'avère que la concentration intracellulaire en calcium joue aussi un rôle majeur dans la régulation de la sensibilité du récepteur nicotinique nAChR2 (Thany et al, 2008). Ce récepteur est atypique par son fonctionnement. Ce récepteur qui est uniquement perméable aux ions potassium est ouvert au repos. En présence de ses agonistes, ce récepteur nicotinique se ferme et sa conductance potassique devient nulle. D'un point de vue électrophysiologique, ceci se traduit par l'inhibition d'un courant potassique sortant lorsque le récepteur est activé. La régulation du récepteur nAChR2 fait intervenir le calcium extracellulaire et des voies de signalisation dépendante du calcium. Il a été observé qu'une diminution de la concentration en

calcium extracellulaire se traduisait par une diminution des courants induits par l'application de nicotine. À l'inverse, une concentration en calcium extracellulaire plus importante (9 mM) que la concentration physiologique (5 mM) entraîne une augmentation de 16% du courant nicotinique. La présence d'un agent chélateur de calcium, le BAPTA, dans le milieu intracellulaire diminue de 80% la réponse nicotinique de nAChR2 malgré une concentration en calcium extracellulaire importante (9 mM). De plus, en présence de chlorure de cadmium, un bloqueur des canaux calciques membranaires, il est observé une réduction d'environ 80% du courant induit par l'application de nicotine (Thany et al, 2008). L'étude de la sensibilité de ce récepteur à différents agonistes a montré que la sensibilité de nAChR2 à l'Acétamipride était diminuée lorsque l'influx de calcium était augmenté (Bodereau-Dubois et al, 2012). Or l'influx calcique peut passer par des canaux calciques s'activant lors d'une dépolarisation de la membrane : les canaux LVA (« Low Voltage-Activated »), les canaux HVA (« High Voltage-Activated ») ou par les TRP γ , tous exprimés dans les DUM neurones (Grolleau et Lapied, 2000). Il a été confirmé que les TRP γ étaient principalement impliqués dans cet influx calcique modulant la sensibilité de nAChR2, car en présence d'un inhibiteur spécifique des TRP γ , le LOE 908, la sensibilité de nAChR2 à l'Acétamipride augmentait. À l'image de nAChR1, l'augmentation progressive de la concentration d'AMPC aura différentes conséquences dans la régulation de nAChR2. À faible concentration, l'AMPC ne modifie pas l'activité des TRP γ , l'ouverture de ces canaux permet de maintenir un flux calcique entrant dans la cellule et augmente ainsi la concentration en calcium intracellulaire, renforçant ainsi la diminution de sensibilité de nAChR2 à l'Acétamipride et inversement lorsque la concentration en AMPC est plus forte. Plus récemment, il a été montré qu'une voie de signalisation dépendante du GMPc, impliquant la PKG, participerait à la modification de la sensibilité de nAChR2 à la nicotine. L'augmentation de la concentration en GMPc intracellulaire augmente l'amplitude des réponses de nAChR2 à la nicotine (Mannai et al, 2016). Néanmoins, certains effets directs du calcium restent encore à éclaircir (Figure 11). Celui-ci pourrait agir *via* l'intermédiaire de la protéine kinase CamKII (Calas-List et al, 2013) suivant les mêmes voies de régulation que pour nAChR1 (Figure 10).

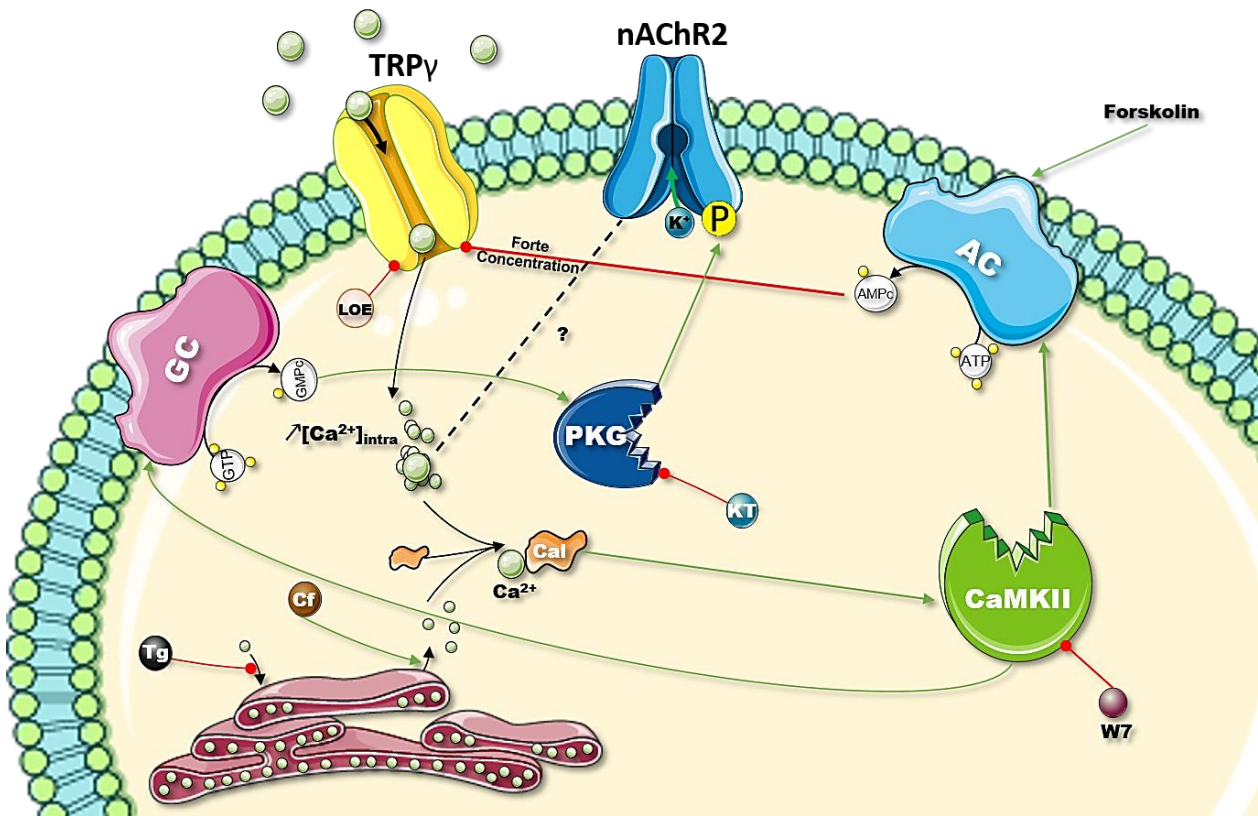


Figure 11. Schéma récapitulatif des potentielles voies de signalisation impliquées dans la régulation de nAChR2. Respectivement, les flèches vertes, ou rouges, sont les voies ou molécules allant activer, ou inhiber, les différents éléments cellulaires. Les abréviations utilisées sont : K⁺ = Ion potassium ; AC = Adénylate Cyclase ; GC = Guanylate cyclase ; [Ca²⁺]_{intra} = Concentration en calcium intracellulaire ; Cal = Calmoduline ; CaMKII = protéine kinase Sérine/Thréonine dépendante du complexe Ca²⁺/Calmoduline ; PKG = Protéine Kinase dépendante du GMPc ; GMPc : Guanosine Monophosphate ; GTP = Guanosine Triphosphate ; AMPc = Adénosine Monophosphate ; ATP = Adénosine Triphosphate ; Tg = Thapsigargine ; Cf = Caféine ; W7 = N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide ; KT = KT5823.

7. Localisation et rôle des récepteurs nicotiniques dans la physiologie des insectes

Les récepteurs nicotiniques peuvent être retrouvés dans de nombreux phylums « primitifs » et se retrouver très diversifiés (Skok, 2009). De récentes études ont montré l'existence de très nombreux gènes codants pour des récepteurs nicotiniques chez les mollusques, allant jusqu'à 217 pour *Pinctada fucata martensii* (Jiao et al, 2019). Cette diversification extrême, aussi bien génétique que fonctionnelle, laisse penser que les récepteurs peuvent être impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Il a été mis en évidence que les tissus nerveux d'insecte sont des sources très riches en récepteurs nicotiniques que l'on retrouve au niveau synaptique et extra-synaptique (Sattelle, 1980; Thany et Tricoire-Leignel, 2011), laissant suggérer un rôle physiologique majeur.

7.1. Les nAChRs synaptiques

L’importance de ces récepteurs nicotiniques dans la physiologie des insectes réside dans le fait que l’acétylcholine est le neurotransmetteur excitateur majoritaire dans leur système nerveux central. Hormis les connexions neuronales de type glutamatergique au niveau de leurs jonctions neuromusculaires (Usherwood, 1994), la transmission des informations nerveuses se fait, entre autres, grâce à ce neurotransmetteur *via* les récepteurs nicotiniques (Figure 12).

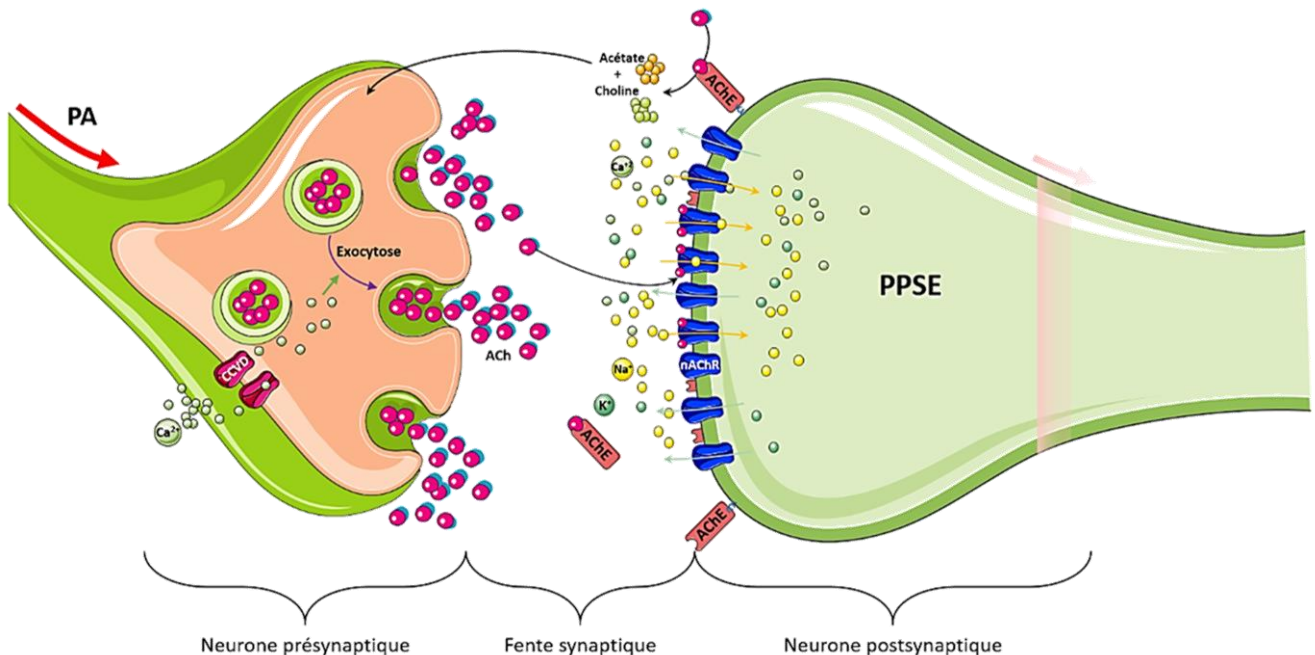


Figure 12. Représentation schématique d'une synapse cholinergique entre deux neurones. Les abréviations utilisées sont : PA = Potentiel d'action ; CCVD = Canaux Calciques Voltage Dépendant ; Na⁺ = ions Sodium ; K⁺ = ions Potassium ; Ca²⁺ = ions Calcium ; AChE = Acétylcholinestérase ; PPSE = Potentiel post-synaptique excitateur ; Flèche jaune : Flux net d'ion (Entrée de Ca²⁺ et Na⁺, Sortie de K⁺)

Les neurones postsynaptiques possèdent des récepteurs majoritairement nicotiniques comme cela a pu être démontré par la stimulation électrique d'un nerf cercal de blatte *Periplaneta americana*, entraînant la génération d'un potentiel postsynaptique excitateur dans les interneurons du dernier ganglion abdominal. Cette stimulation pouvait être reproduite par l'application d'acétylcholine au niveau de cette structure (Hue et Callec, 1990). Chez *Manduca sexta*, le sphinx du tabac, la transmission nerveuse monosynaptique entre une fibre mécanosensorielle et un motoneurone déclenche un réflexe musculaire se faisant *via* le système cholinergique. Ceci a été prouvé par la stimulation électrique du neurone afférent, par l'application d'agonistes ou d'antagonistes nicotiniques au niveau de la synapse et l'enregistrement des signaux électriques dans le motoneurone. L'enregistrement de PPSE dans le corps cellulaire du motoneurone, contenu dans le ganglion A5 de *Manduca sexta*, a permis de préciser les propriétés nicotiniques de cette transmission synaptique (Trimmer et Weeks, 1989).

La démonstration d'une transmission nerveuse se faisant par l'intermédiaire des récepteurs nicotiniques a également été démontrée chez la drosophile *Drosophila melanogaster* avec les études de Su (Su et O'Dowd, 2003) et Gu (Gu et O'Dowd, 2006). La culture *in vitro* de cellules neuronales de drosophile capables de former un réseau de neurones a permis d'observer la formation de faibles courants spontanés qui peuvent être bloqués en présence d'antagonistes.

7.2. Les nAChRs pré- et extra-synaptiques

Par définition les nAChRs pré- et extra-synaptiques ne sont pas impliqués directement dans la transmission d'un message nerveux au niveau d'une synapse. L'existence de ces nAChRs a été supposée à partir de l'étude du neurone sensoriel latéral chez la blatte *Periplaneta americana* (Blagburn et Sattelle, 1987; Thany et Tricoire-Leignel, 2011). L'application de carbamylcholine sur l'axone de ce neurone sensoriel a permis de mesurer une réponse cholinergique. Or, cette zone est dénuée de toutes connexions synaptiques afférentes proches du point d'application de cet agoniste. Ceci laisse alors supposer que la réponse cholinergique enregistrée provenait de l'activation de récepteurs nicotiniques exprimés sur l'axone de ce neurone sensoriel et ne participant pas à la formation d'une synapse. Ces nAChRs ont été caractérisés comme extrasynaptiques (Blagburn et Sattelle, 1987). Plus récemment, il a été caractérisé des nAChRs extrasynaptiques capables de moduler la libération d'un neurotransmetteur, la dopamine, chez des larves de drosophile (Pyakurel et al, 2018). La libération de dopamine par la chaîne nerveuse ventrale des larves est dépendante de l'activation des nAChRs par l'ACh, la nicotine, le Nitenpyrame et l'Imidaclopride. L'ajout de ces agonistes provoque la libération de dopamine alors que l'application d'antagoniste tel que l' α -bgt induit une diminution d'environ 40% de la quantité de dopamine constitutivement excrétée. Le caractère extrasynaptique de ces nAChRs repose dans le fait qu'il participe à l'exocytose de vésicules contenant de la dopamine. Ce phénomène d'exocytose nécessite l'intervention d'un potentiel d'action propagé par les canaux sodiques dépendants du potentiel. Or, lorsque ces derniers sont bloqués par de la tétrotoxine, l'application d'un agoniste nicotinique permet de conserver une libération de dopamine, certes diminuée, mais toujours présente. L'exocytose d'un neurotransmetteur ainsi que la modulation de son excrétion se faisant au niveau de l'élément présynaptique, les auteurs suggèrent la présence de nAChR au niveau de l'élément présynaptique. De plus, la composition en sous-unité de ces récepteurs nicotiniques présynaptiques a pu être déterminée. L'application de dihydro- β -érythroïdine, un antagoniste sélectif des récepteurs de vertébrés contenant la sous-unité β 2 ou β 4, a entraîné une diminution presque totale de la libération de dopamine par l'acétylcholine. Une autre précision sur la composition en sous-unité a été apportée par l'utilisation de 2 souches mutantes pour les sous-unités α 1 ou β 2 conférant une résistance au Nitenpyrame et à l'Imidaclopride. La libération de dopamine a été observée lors de l'application de nicotine chez ces 2 souches alors que l'application de Nitenpyrame et d'Imidaclopride n'induit pas la libération de dopamine dans la souche résistante. Ainsi, des récepteurs nicotiniques qui contiennent, au moins, les sous α 1 et β 2 et qui sont activés par le Nitenpyrame et l'Imidaclopride participerait à

l'exocytose de la dopamine. Selon Pyakurel et collègues, la libération de dopamine est donc modulée par des récepteurs nicotiniques présynaptiques composés, au moins, des sous-unités $\alpha 1$ ou $\beta 2$, sensibles à ces agonistes (Pyakurel et al, 2018).

7.3. Rôle physiologique des nAChRs

Le rôle des nAChRs dans la transmission synaptique rapide des messages nerveux, leur localisation pré et extrasynaptique, ainsi que leurs implications dans des voies de signalisation intracellulaires, telles que la modulation de la libération de dopamine, suggèrent que les récepteurs nicotiniques pourraient être impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques chez les insectes.

7.3.1. Rôles des nAChRs dans les fonctions cognitives

Il a été montré que les récepteurs nicotiniques participent à des fonctions cognitives telles que la mémoire chez l'abeille (Gauthier et al, 2006). L'injection d'antagonistes nicotiniques au niveau des corps pédonculés et des lobes antennaires qui sont des structures neuronales impliquées dans l'apprentissage olfactif et la mémoire, entraîne un déficit des fonctions cognitives chez l'abeille, et plus précisément dans l'apprentissage olfactif. Des nAChRs sensibles à l' α -Bgt et à la méthyllycaconitine participeraient à la formation de la mémoire à long terme, alors que l'apprentissage ainsi que le rappel des informations passeraient par les nAChRs insensibles à l' α -Bgt, mais sensibles à la mécamylamine (Gauthier et al, 2006). En particulier, nous pouvons prendre l'exemple de la sous-unité $\alpha 8$ de l'abeille *Apis mellifera*. La participation de cette sous-unité à ces fonctions cognitives a été démontrée par l'utilisation de siRNA injectés dans le cerveau de l'abeille ou dans des structures plus précises telles que les lobes antennaires, les calices et les lobes verticaux des corps pédonculés. La diminution effective des niveaux d'expression d'ARNm a été observée 3h après l'injection de siRNA alors qu'une diminution de la quantité de protéine Amel $\alpha 8$ a été mesurée 6h après l'injection dans ces structures. L'injection de siRNA ciblant la sous-unité Amel $\alpha 8$ dans le cerveau, 6h avant l'apprentissage ne perturbe pas l'apprentissage olfactif des abeilles alors que, l'injection de siRNA 6h avant le test de rappel entraîne un déficit transitoire de discrimination des odeurs. De plus, la diminution d'expression d'Amel $\alpha 8$ au niveau des lobes verticaux diminue significativement les performances des abeilles lors de l'apprentissage, mais aussi lors du rappel des informations olfactives. Il se pourrait alors que les récepteurs sensibles à la mécamylamine impliqués dans le rappel des informations olfactives, décrits dans l'étude de Gauthier et collègues (Gauthier et al, 2006) soient composés, en partie, de la sous-unité Amel $\alpha 8$.

7.3.2. Rôles des nAChRs dans la locomotion

L'étude de drosophiles mutantes pour le gène codant la sous-unité D $\alpha 7$ a permis de mettre en évidence l'implication de cette sous-unité nicotinique dans le comportement de fuite (Fayyazuddin et al, 2006). La sous-unité D $\alpha 7$ participe au comportement de fuite en s'exprimant dans l'interneurone géant reliant le neuropile visuel et les motoneurones innervant les muscles

responsables du vol chez la drosophile. L'activation de récepteurs composés, entre autres, de la sous-unité $D\alpha 7$ participe à la transmission nerveuse de l'information visuelle à l'interneurone géant de drosophile afin de déclencher ce comportement. Or, les drosophiles mutantes pour la sous-unité $D\alpha 7$ présentent une diminution importante du comportement de fuite induit par une stimulation visuelle. Plus récemment, il a été montré chez des larves de drosophiles l'implication de nAChRs dans le comportement de locomotion (Malloy et al, 2019). L'intoxication de larve avec l'ajout d'agoniste (nicotine) ou d'antagoniste (tubocurarine) dans leur nourriture a permis de déterminer le rôle joué par les nAChRs dans la modulation de l'excitabilité générale du circuit sensoriel et moteur chez les larves. De manière surprenante, la nicotine aurait un effet inhibiteur sur la locomotion, car celle-ci entraînerait une désensibilisation rapide des nAChRs conduisant à une diminution de la mobilité. De plus, une étude portant sur une analyse globale des gènes impliqués dans la locomotion chez la drosophile a montré l'implication de sous-unités nicotiniques $D\alpha 1$ et $D\alpha 3$. L'induction de phénotype particulier a été réalisée grâce à l'utilisation d'ARN interférent ciblant les gènes orthologues à ceux impliqués dans la locomotion chez *Cenorhabditis elegans*. Il s'est avéré que les ARN interférents ciblant les sous-unités nicotiniques $D\alpha 1$ et $D\alpha 3$ induisaient les phénotypes présentant les problèmes de locomotion les plus sévères (Aleman-Meza et al, 2017).

7.3.3. Rôles des nAChRs dans le sommeil et le rythme circadien

Le système cholinergique, et en particulier les récepteurs nicotiniques, participe au comportement de sommeil chez les insectes. Ce comportement se caractérise par une posture spécifique pour laquelle aucun mouvement n'est observé. Les seuils de sensibilité sensorielle pour déclencher une réaction sont très élevés, néanmoins le sommeil peut être interrompu par une stimulation importante. Le sommeil est un critère comportemental important car une privation de sommeil chez les insectes se traduit par un stress voire un raccourcissement de l'espérance de vie (Helfrich-Förster, 2018). L'implication du système cholinergique dans la fonction de sommeil commence par la présence d'une protéine appelée « *sleepless* » qui interagit avec les nAChRs en inhibant leur activation et réduisant ainsi la transmission synaptique. Chez des drosophiles mutantes pour le gène SLEEPLESS, les phases de sommeil sont fortement diminuées, avec une durée de 2h par jour, au lieu des 8h-10h habituelles. L'utilisation de mécamylamine, un antagoniste des récepteurs nicotiniques, d'ARN interférent ciblant la sous-unité $D\alpha 3$ ou d'ARNi ciblant la sous-unité $D\beta 3$, permet de restaurer un comportement de sommeil normal. La protéine *sleepless*, favorisant le sommeil, interagirait préférentiellement avec des récepteurs nicotiniques composés de ces 2 sous-unités afin de réduire la transmission synaptique globale (Wu et al, 2014; Helfrich-Förster, 2018). L'identification d'une autre sous-unité nicotinique impliquée dans le sommeil chez les insectes, et interagissant avec *sleepless*, a été réalisée sur des drosophiles mutantes appelées *redeye* présentant un phénotype caractérisé par une altération de la durée du sommeil. L'étude du génome de ces mutants *redeye* a permis de mettre en évidence une mutation d'une thréonine en méthionine dans la séquence protéique de

la sous-unité D α 4. La durée de sommeil chez la drosophile serait donc sous le contrôle de la sous-unité D α 4. De plus, l'utilisation d'ARN interférent ciblant la sous-unité D α 4 a permis de corrélérer une diminution de son expression avec une réduction de la durée du sommeil (Shi et al, 2014).

Le comportement de sommeil est sous le contrôle de l'horloge interne ou rythme circadien. Le rythme circadien est dépendant de l'information lumineuse provenant de la périodicité jour/nuit. Or, la nature de cette information, sa synchronisation et sa rythmicité est transmise des organes sensoriels vers les structures neuronales de l'horloge interne *via* une signalisation impliquant des nAChRs (Tasman et al, 2020). Les comportements nécessitant un rythme journalier ou saisonnier tel que le sommeil, la recherche de nourriture ou la reproduction sont alors dépendants du fonctionnement des nAChRs. Il a été montré qu'une exposition à des doses sublétales de néonicotinoïdes tels que l'Imidaclopride, la Clothianidine et le Thiametoxame entraînait une réduction de la rythmicité du cycle circadien. De plus, cette réduction a été observée comme dépendante de ces doses sublétales représentatives de celles retrouvées dans l'environnement, où, plus la concentration sublétale augmentait et plus la réduction était forte. Les auteurs ont alors utilisé des ARN interférents ciblant les sous-unités D α 1 et D β 2. Leur utilisation entraîne une perte de rythmicité similaire à celle observée lors d'une exposition à une dose sublétale de néonicotinoïdes. De plus, l'extinction de la sous-unité D β 2 limite l'impact des néonicotinoïdes sur le rythme circadien. Ceci suggère que la sous-unité D β 2 participe à l'action des néonicotinoïdes sur les cellules nerveuses responsables du rythme circadien (Tasman et al, 2020).

7.3.4. Rôles des nAChRs dans la reproduction

Enfin, la reproduction chez les insectes ferait également intervenir le système cholinergique et plus particulièrement la sous-unité nicotinique D α 1. Il apparaît que la réalisation de la reproduction chez la drosophile, faisant intervenir des comportements nuptiaux et de copulations, nécessiterait l'expression de la sous-unité D α 1. En effet, des mutants mâles *knock-out* pour cette sous-unité présentent un retard dans le déclenchement des comportements nuptiaux comparés aux comportements des mâles témoins. Il a été observé également un allongement global de la durée d'initiation de la copulation chez des mâles et des femelles n'exprimant pas cette sous-unité (Somers et al, 2017).

Chapitre 2 : Les insecticides ciblant les récepteurs nicotiniques

1. Généralités

Étant donné l'importance des nAChRs dans diverses fonctions physiologiques, ces récepteurs sont devenus la cible privilégiée de nombreux insecticides. Les insecticides ciblant les nAChRs ont été utilisés afin de lutter contre les insectes résistants aux insecticides préalablement utilisés. Il est ainsi possible de dresser un historique des utilisations de ces produits phytosanitaires corrélés à la découverte, quelques années plus tard, d'insectes capables de résister à ces insecticides (Figure 13) (Melander, 1914; Wiesmann, 1947; Newcomer et Dean, 1952; Smith, 1961; Hooper, 1968; Prasittisuk et Busvine, 1977; Cahill et al, 1996; Scott et Wen, 1997; Koo et al, 2014; Smith et al, 2016; Liao et al, 2020).

Insecticide	Premier cas de résistance	Références
Insecticide minérale Sulfocalcide	<i>Quadraspidotus perniciosus</i> 1908-1914	Melander 1914
Organochlorés DDT 1939-1945	<i>Musca domestica</i> 1947	Wiesmann 1947
Organophosphates Parathion 1948	<i>Panonychus ulmi</i> 1951	Newcomer et Dean 1952
Carbamates Carbaryl 1956	<i>Epiphyas postvittana</i> 1961	Smith 1961 -Hooper 1968
Pyréthrénoïdes Perméthrine 1972	<i>Aedes aegypti</i> 1977	Prasittisuk et Busvine 1977
Phénylpyrazoles Fipronil 1993	<i>Musca domestica</i> 1997	Scott et Wen 1997
Néonicotinoïdes Imidaclopride 1994	<i>Bemisia tabaci</i> 1996	Cahill et al. 1996
Sulfoximines Sulfoxaflor 2011	<i>Aphis gossypii</i> 2014	Koo et al. 2014
Buténolides Flupyradifurone 2014	<i>Bemisia tabaci</i> 2014	H. A. Smith et al. 2016
Mésioioniques Triflumezopyrime 2015	<i>Nilaparvata lugens</i> 2020	Liao et al. 2020

Figure 13. Représentation schématique de l'évolution de l'utilisation d'insecticides au cours du temps. Il est rapporté ici les premiers cas de résistance avérés d'insecte, sur le terrain ou en laboratoire, en fonction des différentes classes d'insecticides et ayant fait l'objet d'une publication scientifique. Le site <https://www.pesticideresistance.org/> recense les résistances d'insectes observées pour tout produit phytosanitaire disponible sur le marché.

D'après la figure 13, les résistances observées apparaissent seulement quelques années après la première utilisation d'un insecticide. De plus, les phénomènes de résistance ne se limitent pas à quelques insectes. On observe depuis la moitié du 20^{ème} siècle une augmentation en palier du nombre d'espèces d'insectes résistants à au moins un insecticide. En 2002, Denholm rapporte au niveau mondial plus de 500 espèces d'insectes résistantes à au moins un insecticide (Denholm, 2002) (Figure 14). Ce chiffre est en augmentation avec le recensement de plus de

600 espèces en 2017 (Borel, 2017). Néanmoins, malgré cette augmentation, ces insecticides continuent d'être utilisés en agriculture, en accord avec les réglementations de chaque pays.

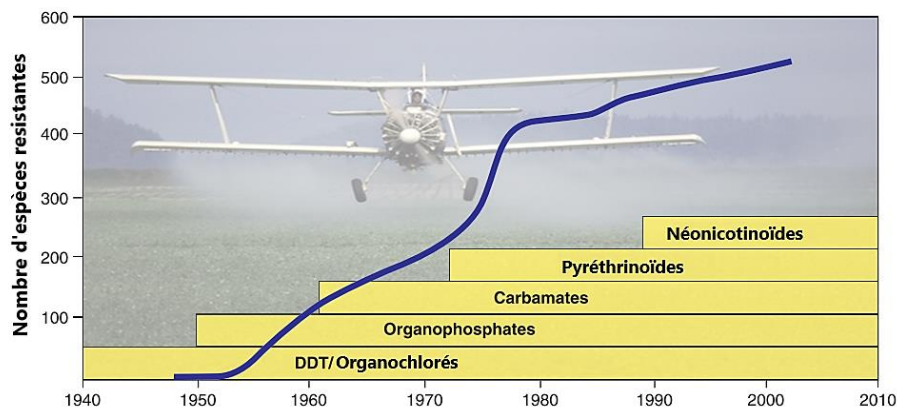


Figure 14. Évolution du nombre d'espèces d'insectes résistantes aux insecticides. Modifiée d'après Denholm 2002.

Les molécules à effet insecticide ont été nommées selon leurs natures chimiques et classées par catégories en fonction de leur mode d'action. Nous aborderons dans cette partie uniquement les molécules ciblant les nAChRs. Ces molécules sont classées dans la catégorie 4 des modes d'action établis par l'IRAC (« Insecticide Resistance Action Committee »), ce qui correspond à des molécules ayant un rôle de modulateur compétitif sur les nAChRs. Cela signifie que ces insecticides se fixent sur le site orthostérique des nAChRs et provoquent une gamme de symptômes allant de l'hyperexcitation à la paralysie des insectes (Insecticide Resistance Action Committee | IRAC; Sparks et Nauen, 2015). Puis, nous nous concentrerons principalement sur les néonicotinoïdes, et plus particulièrement sur l'Imidaclopride, l'insecticide utilisé dans ces travaux de thèse.

2. Les différentes familles d'insecticides

2.1. La nicotine

La nicotine est un alcaloïde produit par le plant de tabac, *Nicotiana tabacum*. On peut également la retrouver dans des plantes appartenant à la famille des Solanacées telles que *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* et *Solanum melongena*. Cette phytotoxine fait partie des nombreuses molécules synthétisées par les plantes. Elles ont pour but de défendre la plante face à un prédateur en rendant toxiques les organes vitaux des plantes tels que les feuilles, les racines et la sève. La caractérisation de l'effet insecticide de la nicotine remonte à 1690 par Jean de la Quintinie qui utilisait des macérations de pied de tabac qu'il pulvérisait sur ses cultures afin de les protéger contre les ravageurs (Darriet, 1998). Néanmoins, certains insectes se trouvent être naturellement résistants à cette molécule tels que l'aleurode du tabac, *Bemisia tabaci*. L'utilisation de la nicotine dans l'agriculture reste aujourd'hui très limitée de par sa difficulté

d'extraction, de sa toxicité moyenne vis-à-vis des mammifères et d'une toxicité importante pour les poissons et les oiseaux (Casida, 2018).

2.2. Les buténolides

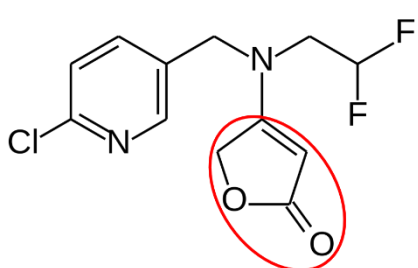


Figure 15. Molécule de Flupyradifurone. En rouge est entouré le pharmacophore de type buténolide.

Le premier insecticide de la classe des buténolides mis sur le marché fut le Flupyradifurone, un insecticide synthétique mis au point par Sivanto et mis sur le marché en 2014 (Jeschke et al, 2015). Cette molécule (Figure 15) s'inspire d'une phytotoxine alcaloïde, la stémofoline, que l'on retrouve principalement dans les plantes de la famille des Stemonaceae telles que la *Stemona japonica*. La stémofoline a montré des effets insecticides intéressants (Tamura et al, 1978; Sakata et al, 1978; Kaltenecker et al, 2003), c'est pour cela que cette molécule a servi de molécule initiale dans la conception du Flupyradifurone.

La recherche de composé synthétique dérivant de la structure de la stémofoline à mener à la découverte de cette nouvelle classe d'insecticides, les buténolides, dont le premier représentant est l'énamino-carbonyl. L'optimisation de l'effet insecticide de ce composé a abouti à la sélection d'une molécule efficace contre les insectes piqueurs-suceurs, le Flupyradifurone (Jeschke et al, 2015; Nauen et al, 2015). Ce nouvel insecticide agit comme un agoniste des nAChRs, capable de déplacer l'Imidaclopride radiomarquée ($CI_{50} = 2,38$ nM) sur des récepteurs nicotiniques natifs de mouche domestique (Nauen et al, 2015). Des résultats obtenus en électrophysiologie sur des neurones isolés de noctuelles *Spodoptera frugiperda* ont montré que le Flupyradifurone (FPF) est un agoniste partiel des nAChRs. En effet, la réponse induite par l'application de FPF à la concentration maximale de 30 μ M ne représentait que 56% du courant induit par l'application de 1mM d'acétylcholine. De plus, le Flupyradifurone n'est pas métabolisable par les enzymes de détoxification impliquées dans la résistance métabolique chez les insectes présentant une résistance à d'autres insecticides tels que les néonicotinoïdes. Ceci laisse alors supposer qu'il est possible d'utiliser le FPF sur ces insectes résistants tels que *Phorodon humuli*, *Myzus persicae*, *Bemisia tabaci* et *Trialeurodes vaporariorum*. Néanmoins, des souches collectées dans différents champs en Floride entre octobre 2013 et décembre 2014 ont montré une résistance prononcée pour ce buténolide, avec des concentrations létales nécessaires pour tuer 50% des individus (CL_{50}) 147 fois supérieures à celle utilisée sur la souche sensible de laboratoire (Smith et al, 2016).

2.3. Les mésoioniques : Triflumézopyrime

Les molécules mésoioniques sont des composés dipolaires ne pouvant être représentés selon la nomenclature chimique classique avec une séparation des charges clairement définie. Par conséquent, les différentes charges ioniques sont délocalisées dans une formule de Lewis représentant une molécule mésoionique. Ce type de composé est relativement rare d'un point

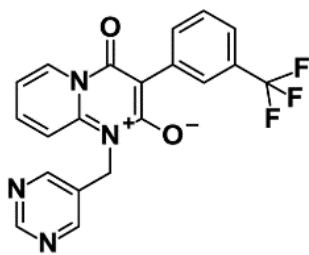


Figure 16. Molécule de Triflumézopyrime avec les charges positives et négatives représentées selon la convention déposée par Dupont™ pour le Pyraxalt™

de vue chimique (Holyoke et al, 2015). À l'heure actuelle, seul le Triflumézopyrime (TMP) appartient à la catégorie 4E de l'IRAC comme étant une molécule mésoionique à effet insecticide (Figure 16). La découverte du TMP a mené à sa mise sur le marché en 2015. L'objectif de base était de mettre au point un fongicide ayant comme précurseur la molécule de pyridopyrimidinone pour aboutir à la fabrication du Proquinazid. Or, pendant l'alkylation de la pyridopyrimidinone, il est apparu 2 coproduits de synthèse : le premier issu d'une alkylation au niveau de l'oxygène (O-alkylation) de la pyridopyrimidinone formant le Proquinazid et un second issu

de l'alkylation au niveau de l'azote du cycle pyrimidine. Cette N-alkylation conduit alors à la formation d'un composé caractérisé comme une molécule mésoionique de couleur jaune. Ce coproduit de réaction n'avait pas d'activité antifongique, mais présentait des effets insecticides. L'optimisation de cette molécule s'est faite par la modification du cycle benzénique, l'ajout de groupements alkyles et la variation de substituants sur les différents cycles. Les différents composés synthétisés ont été évalués par des tests de toxicité sur des insectes ravageurs de culture tels que *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Peregrinus maidis*, *Empoasca fabae*, *Nilaparvata lugens* et *Nephotettix cincticeps*. L'objectif initial était de trouver un nouvel insecticide capable de contrôler des populations d'insectes ravageurs des cultures de riz en Asie tels que *Nilaparvata lugens* et *Nephotettix cincticeps* qui présentent une résistance à un néonicotinoïde, l'Imidaclopride (Holyoke et al, 2015). Les composés ayant un fort effet insecticide sur ces insectes résistants ont été retenus. Le Triflumézopyrime est celui ayant la plus grande efficacité contre ces insectes. De plus, des tests de mortalité réalisés avec des blattes américaines ont montré que la DL_{50} est évaluée à 0,5 nmol/g, ainsi, environ 130 ng de TMP sont nécessaires pour tuer 50% d'une population de blattes pesant 0,66 g en moyenne, ce qui en fait un insecticide puissant (Holyoke et al, 2015; Cordova et al, 2016). Le mode d'action du TMP a été étudié sur des membranes de cellules neuronales de pucerons *Myzus persicae* et sur des neurones thoraciques de blatte *Periplaneta americana*. Sur le puceron *M. persicae*, il a été observé que le TMP était capable de rentrer en compétition avec la fixation d'Imidaclopride radiomarquée avec une constante d'inhibition de l'ordre du nanomolaire ($K_i = 43$ nM) (Cordova et al, 2016). Étant donné que le TMP se fixe sur le même site que l'Imidaclopride, un mode d'action similaire à l'Imidaclopride a été envisagé pour le TMP. Or, les symptômes d'empoisonnement sont réduits à une léthargie qui conduit à la mort de l'insecte, aucun symptôme d'hyperexcitation n'a été observé après l'injection de TMP chez la blatte. L'étude électrophysiologique réalisée sur des neurones thoraciques de blatte *Periplaneta americana* a permis de montrer que le TMP à la concentration de 200 μ M présente un très faible effet agoniste sur les nAChRs, environ 5% d'un courant initialement induit par 100 μ M d'acétylcholine. À l'inverse, la réponse des nAChRs à l'acétylcholine est réduite de 50% en présence de 0,6 nM de

TMP ($CI_{50} = 0,6 \text{ nM}$), il se trouve donc être un antagoniste des nAChRs (Holyoke et al, 2015). Selon Holyoke (Holyoke et al, 2015) et Cordova (Cordova et al, 2016), le TMP semble inhiber rapidement le courant induit par l'application de $100 \mu\text{M}$ d'acétylcholine passant par les nAChD qui ont été décrits par Salgado (Salgado et Saar, 2004). La toxicité de cet insecticide pour les abeilles est plus faible que celle d'autres insecticides classiquement utilisés tels que les néonicotinoïdes, les phénylpyrazoles ou les carbamates, avec une DL_{50} orale de $0,51 \mu\text{g}/\text{abeille}$ et une DL_{50} de contact de $0,39 \mu\text{g}/\text{abeille}$ à 72h (Holyoke et al, 2015). L'apparition de résistance à cet insecticide a été observée la même année que celle de sa mise sur le marché. En effet, des prélèvements de terrain de *Nilaparvata Lugens*, en 2015 à Nanchang dans la région du Jiangxi en Chine, a montré que les descendants des échantillons récoltés étaient capables de résister au TMP avec un ratio de résistance de 7,3 comparé à la souche sensible (Liao et al, 2020).

2.4. Les sulfoximines : exemple du Sulfoxaflore

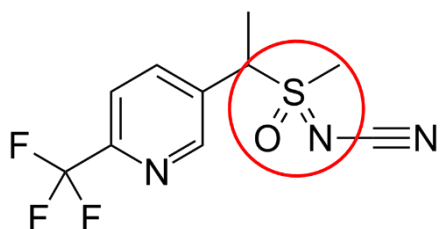


Figure 17. Molécule de Sulfoxaflore. En rouge est entourée la molécule de sulfoximine donnant son nom à la classe d'insecticide.

Le seul représentant des insecticides de la classe des sulfoximines ayant un mode d'action de type 4C selon l'IRAC est le Sulfoxaflore (SFX) (Figure 17). Le SFX est un insecticide développé en réponse à l'augmentation des résistances observées chez les insectes piqueurs-suceurs. À la base de la molécule de sulfoximine ont été rajoutés différents éléments, chacun ayant pour but d'augmenter l'effet insecticide observé sur un insecte piqueur-suceur : le puceron *Myzus persicae*. Dans un premier temps, une structure semblable à ce que l'on retrouve chez les néonicotinoïdes, une chlorepypyridine, a été ajoutée à une molécule de sulfoximine afin de conférer un effet insecticide dirigé contre les insectes piqueurs-suceurs. Puis, un groupement cyano ($-C\equiv N$) a permis de renforcer l'activité insecticide de ce composant (Figure 17). Enfin, la substitution du chlore de la pyridine par un groupement trifluorométhyle ($-CF_3$) a finalement maximisé l'effet insecticide et cette molécule a donc été retenue et nommée Sulfoxaflore (Zhu et al, 2011; Sparks et al, 2013). Les symptômes d'empoisonnement du Sulfoxaflore sont similaires à ceux observés avec des insecticides qui sont des agonistes des nAChRs, c'est-à-dire une hyperexcitation accompagnée de tremblements importants, suivis d'une paralysie totale entraînant la mort. Ces symptômes ont été observés chez le puceron *Myzus persicae*, la mouche *Drosophila melanogaster* et la blatte *Periplaneta americana* (Zhu et al, 2011). Une étude électrophysiologique réalisée sur des ovocytes de Xénope co-exprimant la sous-unité $\alpha 2$ de drosophile avec la sous-unité $\beta 2$ de poulet a permis de montrer que le sulfoxaflore (SFX) agissait sur les nAChRs (Zhu et al, 2011). Le SFX présente un effet agoniste plus important que l'Imidaclopride, car à concentration égale, il induit des réponses plus importantes que celles obtenues avec de l'Imidaclopride. De même, l'application de SFX ($100\mu\text{M}$) permet d'enregistrer une réponse d'amplitude 4,5 fois plus importante que celle obtenue avec l'ACh à la même

concentration (Zhu et al, 2011). Cependant, le SFX présente une affinité moindre pour les nAChRs comparés à l'Imidaclopride et à l'acétylcholine (Watson et al, 2017). L'intérêt de cet insecticide était d'être utilisé sur des insectes présentant des ratios de résistance importants pour les néonicotinoïdes. Par exemple, il a été mesuré chez les souches FRC-P de *Myzus persicae* et BY-A d'*Aphis gossypii*, des ratios de résistance à la Clothianidine de plus 3000 et 13 000, respectivement (Zhu et al, 2011; Sparks et al, 2013; Koo et al, 2014). Les tests biochimiques de métabolisation par le cytochrome P450 CYP6G1, impliqué dans le métabolisme de dégradation des néonicotinoïdes chez *Drosophila melanogaster* (Daborn et al, 2002), ont mis en évidence que le SFX n'était pas métabolisé par cette enzyme. Néanmoins, il a été montré qu'une souche de pucerons *Myzus persicae* présente en France, en Espagne et en Italie possédant un ratio de résistance de 43 pour le SFX présente la particularité d'avoir un métabolisme de xénobiotique augmenté (Cutler et al, 2013) ainsi qu'une mutation dans la sous-unité nicotinique M β 1 avec le remplacement d'une arginine par une thréonine en position 81 (R81T). Cette mutation lui confère également une forte résistance aux néonicotinoïdes (Bass et al, 2011). Il a aussi été montré qu'une population de pucerons *Aphis gossypii*, prélevée en 2012 dans la région du Yeosu en Corée du Sud, présentait un ratio de résistance de 464,3 pour le Sulfoxaflor (Koo et al, 2014). Cette résistance est apparue moins de 2 ans après la mise sur le marché du SFX. De plus, il est intéressant de noter que cette souche possède, elle aussi, la mutation R81T dans la sous-unité nicotinique β 1.

2.5. Les néonicotinoïdes

2.5.1 Historique et structures chimiques des néonicotinoïdes

a) Historique

L'appellation néonicotinoïde dérive de la classe d'insecticide de type nicotinoïde proposé par Yamamoto et Kamimura en 1963 (Kamimura et Yamamoto, 1963; Yamamoto et Kamimura, 1963). Les nicotinoïdes désignent des molécules similaires en structure chimique et au mode d'action semblable à la nicotine. La caractéristique essentielle des nicotinoïdes est d'avoir un azote basique capable de se protoner en condition physiologique et ainsi ressembler à l'acétylcholine. Cet azote cationique est nécessaire pour interagir avec le site anionique du récepteur (Tomizawa et Yamamoto, 1993). Bien que les nicotinoïdes présentent un faible pouvoir insecticide, ils ont été utilisés comme insecticide en agriculture (Ujváry, 1999). Leur faible efficacité s'explique par le groupement cationique qui limite son passage à travers la barrière imperméable aux ions, appelée gaine de Hoyle (Burnett et O'Brien, 1968; Rockstein, 1974), entourant le système nerveux central des insectes (Tomizawa et Casida, 2003). Les néonicotinoïdes ressemblent aux nicotinoïdes car ils partagent le même site de fixation et possèdent un cycle pyridine similaire. On retrouve une relation entre la structure et l'activité semblable entre les néonicotinoïdes présentant un atome d'azote, acyclique ou compris dans un hétérocycle, ayant une conformation atomique de type « sp³ », c'est-à-dire uniquement capable

de former des liaisons simples sous la forme d'un tétraèdre (Sparks et al, 2013). Leur différence se fait sur la 2^{ème} moitié de la molécule avec la formation d'un cycle imidazole. La formation de ce cycle entraîne un déplacement d'électron qui va stabiliser la fonction en position 2 du cycle imidazole (i.e. : =N-NO₂ pour l'Imidaclopride). Il est intéressant de remarquer que les néonicotinoïdes (Acétamipride, Imidaclopride, Thiaclopride) possèdent un chlore en position 6 du cycle pyridine leur conférant une forte activité insecticide (Figure 18). Ce chlore aurait pu catégoriser les néonicotinoïdes sous l'autre nom de « Chloro-Nicotinyl » proposé par Tsuboi (Tomizawa et Yamamoto, 1993).

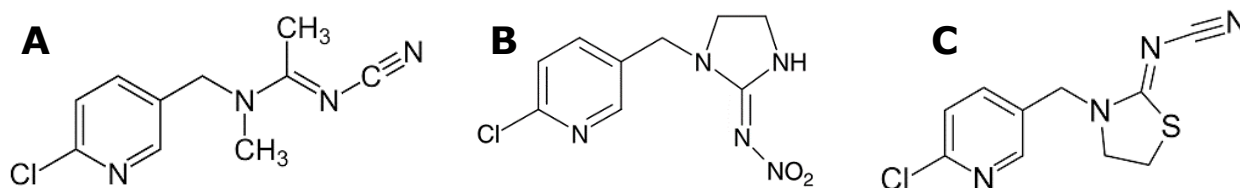


Figure 18 Exemples de molécules appartenant à la famille des néonicotinoïdes avec en A) l'Acétamipride, en B) l'Imidaclopride et en C) le Thiaclopride

b) Structures chimiques des néonicotinoïdes

Certaines molécules classées comme néonicotinoïdes ne présentent pas exactement les caractéristiques décrites précédemment. Il est donc important de comprendre les origines de leur découverte (Tomizawa et Casida, 2005). Les recherches à l'origine de la découverte des néonicotinoïdes portaient sur le criblage de molécules ayant un effet insecticide capable de remplacer les pyréthriinoïdes pour lesquels de nombreux insectes vecteurs de maladie ou ravageurs de cultures étaient résistants. Ces recherches, menées par Shell Development Company, ont fait l'objet d'une découverte en 1978 d'un composé ayant un pouvoir insecticide 17 fois supérieur au Parathion, un organophosphoré de synthèse (Soloway et al, 1978). Le tetrahydro-2-(nitrométhylène)-2H-3-thiazine a donc ouvert la voie aux insecticides à hétérocycle nitrométhylé (Soloway et al, 1979; Matsuda et al, 2020). L'optimisation du pouvoir insecticide de ce produit a permis de mettre au point la Nithiazine, un produit extrêmement efficace comme agent de contrôle des ravageurs de culture. Les propriétés physico-chimiques particulières, telles que la photosensibilité de cette molécule, n'ont pas permis sa commercialisation. Elle a tout de même servi comme base de travail à l'élaboration de composés dérivés plus stables dans l'environnement. Une avancée particulière a été faite par Nihon Tokushu Noyaku Seizo en 1984 lors de l'ajout d'un chlore à un méthylpyridine conduisant à un composé ayant un fort pouvoir insecticide. Cependant, ce composé était toujours photosensible. La stabilisation de la molécule fut trouvée par le couplage de cette molécule avec un cycle imidazole et une nitroguanidine ce qui la rend moins sensible à la lumière (Tomizawa et Casida, 2005). Nous pouvons voir sur la figure 19 les différents groupements cités précédemment dans la molécule d'Imidaclopride qui

fut le premier insecticide de type néonicotinoïde synthétisé pour lequel le brevet a été déposé en 1985.

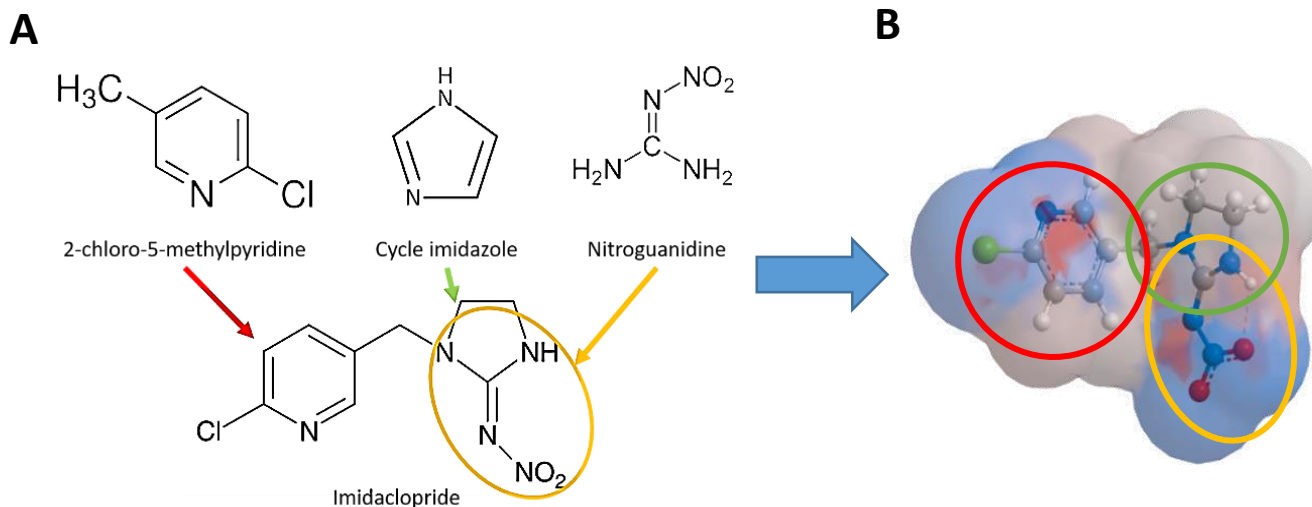


Figure 19. Molécule d'Imidaclopride avec le détail des groupements chimiques le constituant. B) Molécule d'Imidaclopride représentée avec les potentiels électrostatiques positifs en rouge et négatifs en bleu et les groupements chimiques agencés dans une structure 3D.

Les autres néonicotinoïdes sont des dérivés de cette structure obtenus en modifiant un ou plusieurs groupements chimiques (Tomizawa et Casida, 2005; Kagabu, 2011). Ci-dessous sont décrits les différents néonicotinoïdes classés par ordre chronologique en fonction de l'année durant laquelle ils ont été synthétisés pour la première fois.

Le Thiaclopride a été découvert en 1985. Il est composé d'une chlorométhylpyridine, d'un cycle thiazolidine, d'où son nom, et d'un groupement cyanamide. Le Nitenpyram, synthétisé en 1988, est composé d'une chlorométhylpyridine et d'un groupement amino-2-nitroéthène acyclique (Minamida et al, 1993). La découverte de l'Acétamipride a été faite en 1989. L'Acétamipride est également composée d'un groupement chlorométhylpyridine couplé à un dérivé d'une cyanoamidine, le N-cyanoacétamidine méthylé, d'où son nom (Takahashi et al, 1992; Tomizawa et Casida, 2005). En 1989, a été également découverte la Clothianidine qui se compose d'un cycle chlorothiazolyméthyle et d'une nitroguanidine méthylée. Quelques années plus tard, en 1992, le Thiamétoxame a été synthétisé à partir d'un assemblage du même cycle chlorothiazolyméthyle auquel est ajouté un oxadiazinane avec un groupement nitramide. Enfin, le dernier néonicotinoïde synthétisé est le Dinotefuran, découvert en 1994. Ce néonicotinoïde se compose d'un cycle appelé tétrahydrofurane qui est méthylé, auquel s'ajoute une N-nitroguanidine méthylée. Les différents néonicotinoïdes ainsi que leurs structures sont détaillés dans la Figure 20.

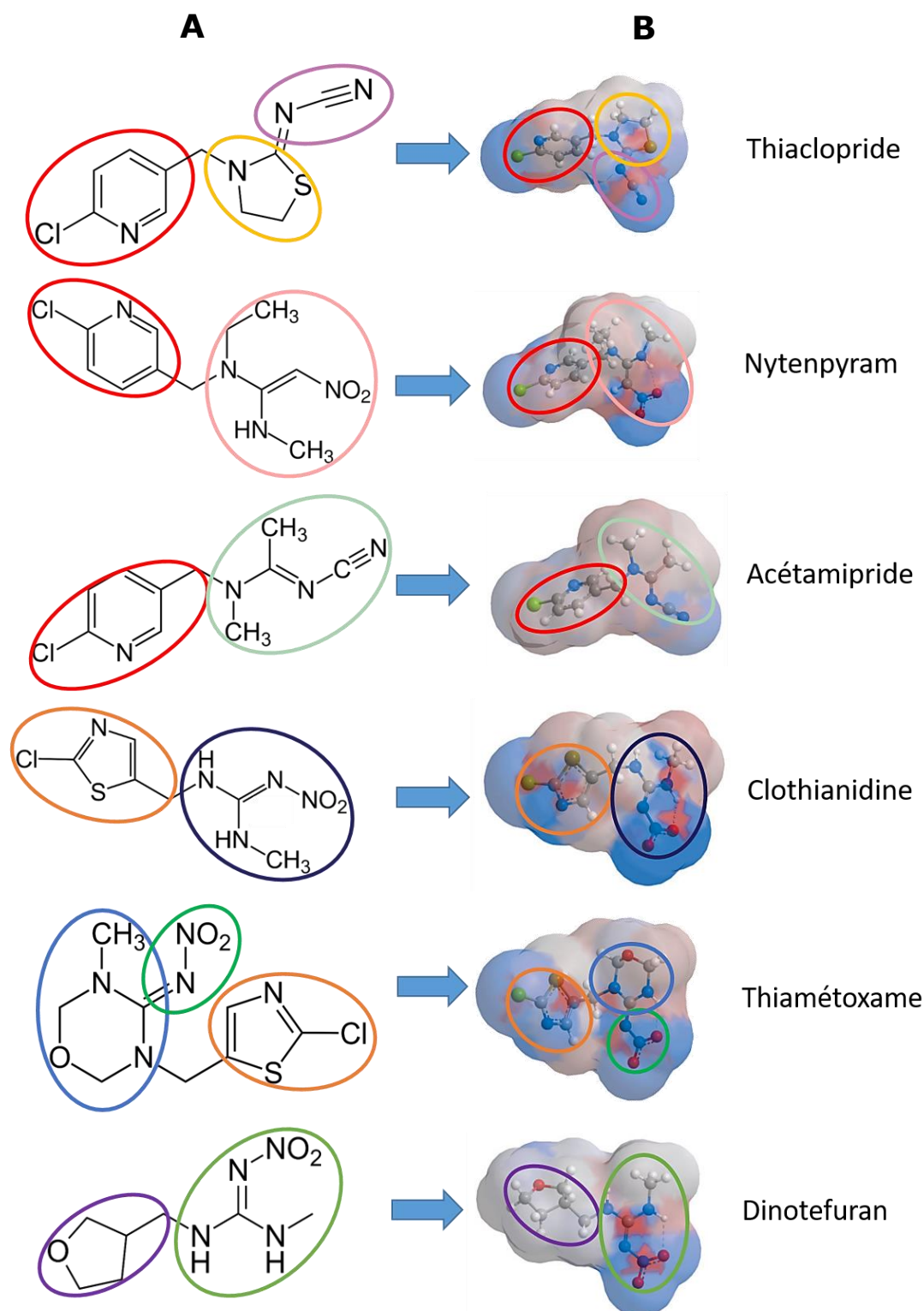


Figure 20. Schéma regroupant toutes les molécules appartenant à la famille des néonicotinoïdes. En A, la représentation de Lewis est donnée pour chaque molécule. En B, la modélisation de ces mêmes molécules est représentée avec les potentiels électrostatiques positifs en rouge et les négatifs en bleu. Les groupements chimiques entourés sont les suivants : Thiachlopride : **chlorométhylpyridine**, **cycle thiazolidine**, **groupement cyanamide** ; Nytenpyram : **chlorométhylpyridine**, **groupement amino-2-nitroéthène acyclique** ; Acétamipride : **chlorométhylpyridine**, **groupement N-cyanoacétamidine méthyli** ; Clothianidine : **cycle chlorothiazolyméthyle**, **nitroguanidine méthyli** ; Thiamétoxame : **cycle chlorothiazolyméthyle**, **oxadiazinane** avec un **groupement nitramide** ; Dinotefuran : **cycle tétrahydrofurane méthyli**, **N-nitroguanidine méthyli**

Les potentiels électrostatiques permettent de visualiser une caractéristique des néonicotinoïdes qui est de mimer le neurotransmetteur naturel : l'acétylcholine (Figure 21).

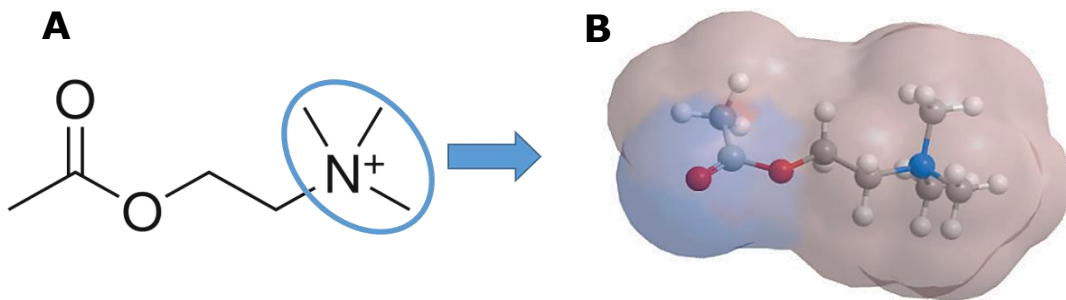


Figure 21. A) Molécule d'acétylcholine avec l'ammonium quaternaire entouré en bleu B) Représentation de la molécule d'acétylcholine orientée de la même manière, avec les potentiels électrostatiques positifs, en rouge, au niveau de l'ammonium quaternaire et les négatifs en bleu au niveau des 2 oxygènes.

L'ammonium quaternaire de l'acétylcholine interagit avec le résidu tryptophane de la boucle B du site de fixation des nAChRs selon une interaction cation- π (Dougherty, 2013). La relation entre la structure et l'activité insecticide des néonicotinoïdes repose sur leurs groupements de type cyano- ou nitro- (en bleu, Figure 20B). Ces derniers, très électronégatifs de par la présence d'azote, interagissent plus facilement avec les résidus basiques chargés positivement situés dans le site de fixation de l'acétylcholine des nAChRs, que l'on retrouve uniquement chez les insectes (Schroeder et Flattum, 1984; Tomizawa et Yamamoto, 1993; Matsuda et al, 2020).

2.5.2 Données économiques et réglementation

Les néonicotinoïdes sont arrivés sur le marché en 1991 avec la mise en vente de l'Imidaclopride par Bayer Crop Science. Ce dernier fait suite aux organochlorés, aux organophosphates, aux carbamates et aux pyréthri-noïdes (Jeschke et al, 2010). Avant 1991, ces 3 derniers types d'insecticides se partageaient un marché de 7,942 milliards d'euros avec la répartition présentée en figure 22.

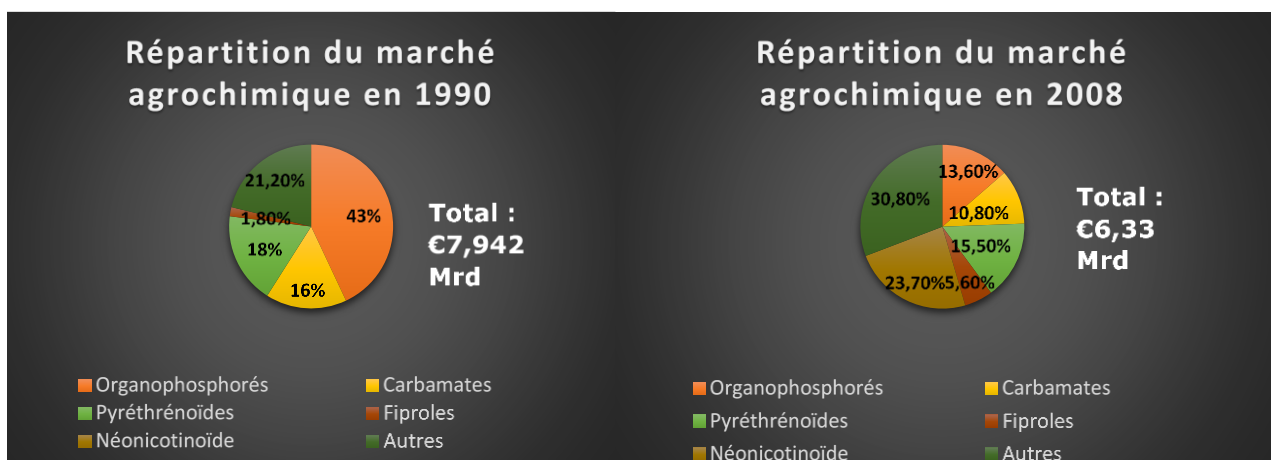


Figure 22. Graphique représentant l'évolution des parts de marché des produits phytosanitaires par catégorie entre 1990 et 2008. Modifiée d'après Jeschke et al, 2011.

En 18 ans, le marché agrochimique a diminué de 1,612 milliards d'euros (Figure 22). Les ventes de néonicotinoïdes en 2008 représentent 1,728 milliards d'euros soit 23,7% du marché global. Les ventes d'organophosphates, de carbamates et de pyréthrénoïdes ont perdu respectivement 29,4%, 5,2% et 2,5% de leur part de marché. Les insecticides classiquement utilisés tels que les organophosphates, les carbamates et les pyréthrénoïdes présentaient de moins en moins d'efficacité de par l'évolution croissante d'espèces résistantes à ces insecticides, ceci a favorisé l'utilisation rapide et importante des néonicotinoïdes (Mallet, 1989; Metcalf, 1989; Georghiou, 1990). De plus, la grande variété des méthodes d'utilisation, dont l'enrobage des semences, couplée à la diversité des cultures pouvant être traitée (arbre fruitier, céréales, betteraves, café, coton, etc.) a accentué l'engouement pour les néonicotinoïdes au début des années 1990 (Jeschke et al, 2010). Par exemple, le traitement des semences par des insecticides a été multiplié par 6,17. En 1990, les carbamates utilisés dans ce but représentaient 77,4% d'un marché de 155 millions d'euros. En 2008, les néonicotinoïdes s'octroyaient 80% de ce nouveau marché des semences estimé à 957 millions d'euros. En considérant toutes les utilisations possibles en agriculture, le marché des néonicotinoïdes représentait la somme de 2,493 milliards d'euros en 2008. Si l'on regarde en détail la part de chaque néonicotinoïde au sein de ce marché de 2,632 milliards de dollars, on constate que l'Imidaclopride représente 41,5% des ventes, soit 1092,28 millions de dollars, à travers le monde en 2009, suivi par le Thiaméthoxame avec 23,82% (627M\$), puis la Clothianidine avec 16,67% (439M\$), l'Acétamipride avec 10,48% (276M\$), le Thiaclopride avec 4,25% (112 M\$), le Dinotefuran avec 3% (79M\$) et enfin le Nitenpyram avec 0,3% (8M\$) (Jeschke et al, 2010). Il semblerait que ces tendances de vente de néonicotinoïdes persistent avec près d'un tiers des parts de marché des insecticides représenté par la vente de néonicotinoïdes en 2015 (Simon-Delso et al, 2015; Sánchez-Bayo et al, 2016). Ceci démontre l'intérêt et la préférence des professionnels de l'agriculture pour leurs utilisations.

Les néonicotinoïdes étaient globalement utilisés sur les champs de maïs, de céréales, de betterave sucrière et de tournesol par épandage direct sur le sol. Ils étaient aussi utilisés sur les cultures fruitières par pulvérisation directe sur les feuillages/fruits. L'enrobage des semences par des néonicotinoïdes a été particulièrement utilisé. La distribution systémique de l'insecticide protège alors le système racinaire, les feuilles et les vaisseaux, préférentiellement ciblés par les ravageurs ayant un mode d'alimentation piqueur-suceur ou broyeur (Laurent et Rathahao, 2003). Cette répartition de l'insecticide fut particulièrement efficace contre les ravageurs de culture tels que les pucerons, les sauterelles, les cicadelles, les scarabées, les charançons, les aleurodes, les thrips et de nombreux lépidoptères. Enfin, l'usage des néonicotinoïdes était autorisé pour les particuliers dans l'entretien des jardins (gazon, plantes ornementales) ou de la maison (termites, blattes).

Le 24 mai 2013, la Commission européenne statue sur la question de l'Imidaclopride, la Clothianidine et le Thiaméthoxame. Il s'avère qu' « au printemps 2012, de nouvelles informations scientifiques relatives aux effets sublétaux des néonicotinoïdes sur les abeilles ont été publiées ».

Ces nouvelles données concernent les risques élevés pour les abeilles d'être exposées à des poussières provenant de cultures traitées ou à du pollen et à du nectar contaminés (European Food Safety Authority, 2013). Ceci conduit à une interdiction de mise sur le marché de semences traitées avec les néonicotinoïdes ainsi que la modification ou le retrait des autorisations pour les produits phytosanitaires contenant de l'Imidaclopride, de la Clothianidine ou du Thiametoxame. À ceci s'ajoute un usage restreint de ces molécules sur des plantes peu attractives pour les abeilles telles que le blé et la betterave, pendant la période hivernale où il y a une absence d'abeille butineuse. Cette première restriction sera conclue en mai 2018 par une interdiction totale de l'utilisation en plein air de ces trois molécules (Food et Authority, 2018). La tendance actuelle vise à interdire totalement l'usage de produits phytopharmaceutiques ayant un impact potentiel ou avéré sur la biodiversité et en particulier les abeilles. Ces mesures peuvent toutefois faire l'objet de dérogation, *via* l'article 53 du règlement européen, s'appliquant lorsqu'un « danger qui ne peut être maîtrisé par d'autres moyens raisonnables » survient, tel que la jaunisse de la betterave qui est un virus véhiculé par le puceron *Myzus persicae* et le puceron noir *Aphis fabae*. Actuellement, le projet de loi n°3298 du 3 Septembre 2020 recense 10 pays¹ ayant eu des dérogations pour cet usage exceptionnel.

2.5.3 Cas particulier de l'Imidaclopride

L'Imidaclopride est le néonicotinoïde le plus utilisé en agriculture. Nous verrons dans cette partie les caractéristiques physico-chimique et toxicologique ainsi que les résistances associées à cet insecticide.

a) Propriété physico-chimique

Le nom UICPA de l'Imidaclopride est le 1-[(6-chloropyridin-3-yl)méthyle]-N-nitroimidazolidin-2-imine. Sa formule chimique brute est $C_9H_{10}ClN_5O_2$ et possède une masse molaire de $255,661 \pm 0,012$ g/mol, pour une densité de $1,54$ g/cm³. À l'état pur, l'Imidaclopride est de couleur jaune pâle. Elle rentre en fusion à la température de 144°C et est très faiblement volatile (9×10^{-7} mPa à 25°C). Sa solubilité est relativement faible avec la possibilité de diluer au maximum 610 mg par litre d'eau. Sa conservation à long terme se fait principalement dans du diméthylsulfoxyde et elle peut y être conservée 18 mois (Gervais et al, 2010; National Center for Biotechnology Information, 2020). Cette molécule est hydrophile avec un coefficient de partage octanol/eau favorisant sa présence dans un milieu aqueux avec un $\text{Log } K_{ow} = 0,57$ à 21°C . Le coefficient de partage carbone organique/eau de l'Imidaclopride, $K_{oc} = 255$ L/kg, indique qu'elle n'est pas capable de s'adsorber sur les sédiments et particules en suspension dans l'eau (INERIS, 2011). L'optimisation moléculaire réalisée lors de la découverte de l'Imidaclopride fait qu'elle est relativement stable en condition environnementale, car elle est peu photosensible si on le compare à la Nithiazine par exemple. Néanmoins, elle subit une

¹ Pologne, Belgique, Danemark, Roumanie, Allemagne, Espagne, Autriche, Croatie, Finlande, Lituanie

dégradation rapide lors d'une exposition forte aux UV et il présente un temps de demi-vie de 57 min en milieux aqueux. En condition d'hydrolyse simple, soit à un pH de 7, on observe une diminution de 1,5% de la concentration initiale en 3 mois. L'Imidaclopride a été sélectionnée pour ses propriétés physico-chimiques, mais aussi pour son adéquation avec les besoins des professionnels de l'agriculture. Ses propriétés physico-chimiques concernant sa capacité à être systémique, sa non-volatilité, sa faible rémanence dans l'environnement comparée à d'autres insecticides sont autant de caractéristiques qui peuvent expliquer son utilisation importante pendant près de 20 ans (Simon-Delso et al, 2015).

b) Toxicologie

Chez le rat, l'Imidaclopride est rapidement absorbée et distribuée dans l'organisme, on la retrouve principalement dans le foie, les reins, les poumons et la peau. Sa capacité à traverser la barrière hématoencéphalique chez le rat est faible car peu d'Imidaclopride radiomarkée y est retrouvée lors de test toxicologique. La dégradation se fait à plus de 90% par le foie et son excrétion, principalement par les urines, est quasi totale 48h après une administration par voie orale. L'Imidaclopride n'a pas d'effet cancérigène avéré chez le rat. Elle n'impacte pas la fertilité et n'est pas tératogène, elle présente néanmoins une toxicité pour les embryons et les fœtus lorsque des femelles gestantes sont exposées à de fortes doses (100 mg/kg). On observe une neurotoxicité avec une diminution de l'activité locomotrice à partir d'une dose de 151 mg/kg. Pour ce qui est de la DL₅₀ ou de la CL₅₀, on observe des disparités entre les modes d'administration (INRS, 2015), avec des toxicités plus importantes chez le rat lorsque l'Imidaclopride est respirée sous forme de poussières ou d'aérosol, alors que la toxicité par contact est nettement plus faible. Pour les oiseaux, ici *Coturnix japonica*, on note une toxicité moyenne avec une DL₅₀ de 31 mg/kg, alors que pour les poissons, ici *Oncorhynchus mykiss*, la toxicité est modérée avec une CL₅₀ de 211 mg/L (Commission Européenne, 2015; Casida, 2018) (Tableau 8).

Espèces	Voie d'administration	DL ₅₀ ou CL ₅₀
Rat	Ingestion	DL ₅₀ = 500 mg/kg
	Inhalation	Poussière : CL ₅₀ = 5,323 mg/m ³
		Aérosol : CL ₅₀ = 69 mg/m ³
	Contact	DL ₅₀ > 5g/kg
Abeille	Ingestion	3,7 ng < DL ₅₀ < 40,9 ng par abeille
Oiseaux	Ingestion	DL ₅₀ = 31mg/kg
Poissons	Ingestion	LC ₅₀ = 211mg/kg

Tableau 8. Tableau rapportant la dose ou concentration d'Imidaclopride entraînant 50% de mortalité en fonction des espèces et des voies d'administration. Les toxicités faibles sont représentées en vert, les toxicités modérées en jaune, les toxicités variables en orange et les fortes toxicités en rouge. D'après Schmuck et al, 2001; European Commission, 2015 ; Casida, 2018.

Les toxicités les plus importantes sont observées pour les arthropodes. On peut prendre en exemple un insecte pollinisateur tel que l'abeille où la DL₅₀ orale est comprise entre 3,7 ng et 40,9 ng par abeille (Schmuck et al, 2001; Commission Européenne, 2015). On peut voir que l'avantage de l'Imidaclopride est d'être plus toxique pour les insectes que pour les mammifères. Cette différence de toxicité dépend de la sélectivité de l'Imidaclopride pour les nAChRs d'insectes par rapport à ceux de mammifères. Dans son étude, Casida (2018) rapporte un ratio de sélectivité pour l'Imidaclopride de 600 entre les nAChRs d'insectes et les nAChRs de mammifères. Ainsi, cet insecticide est 600 fois plus sélectif pour les nAChRs d'insectes que pour les nAChRs de mammifères (Casida, 2018).

c) Site de fixation

La toxicité des néonicotinoïdes chez les insectes repose sur sa conformation spatiale. Il a pu être mis en évidence des acides aminés participant au site de fixation de ces insecticides permettant d'expliquer la spécificité des néonicotinoïdes vis-à-vis des nAChRs d'insectes. Des expériences de mutagenèse dirigée réalisées sur la sous-unité nicotinique D α 2 de drosophile ont montré que la boucle C ainsi que l'intervalle entre la boucle B et C participent au site de fixation de l'Imidaclopride (Shimomura et al, 2004). Il s'avère que les acides aminés présents dans la boucle D participent également à la fixation de l'Imidaclopride. Des expériences de mutagenèse dirigée réalisées sur la sous-unité α 7 de poulet ont permis de mettre en évidence différentes mutations qui modifient la sensibilité du nAChR à l'Imidaclopride. Il a été montré que le remplacement de la glycine en position 189 par des acides aminés chargés négativement à pH physiologique tel que l'acide aspartique (G189D) ou l'acide glutamique (G189E) entraînent une diminution de la réponse induite par l'application d'Imidaclopride. Cette diminution de réponse proviendrait d'une présence trop importante de charge négative dans le site de fixation du nAChR composé des sous-unités α 7 mutées ce qui repousse la charge négative portée par la partie nitroguanidine de l'Imidaclopride. Cependant, ces mutations ne modifieraient pas la réponse à l'acétylcholine et à la nicotine qui possèdent toutes les deux une charge positive au niveau de leur pharmacophore (Figure 21A). De plus, le remplacement de la glycine en position 189 par de l'asparagine (G189N) ou la glutamine (G189Q) qui sont des acides aminés polaires non chargés, permettait de retrouver une sensibilité à une dose élevée d'Imidaclopride (1 mM) (Matsuda et al, 2000). Des expériences similaires ont été réalisées avec la sous-unité D α 1 de la drosophile. La co-expression de la sous-unité β 2 de poulet avec la sous-unité D α 1 sauvage ou mutée a permis de mettre en évidence que les mutations S221E, R57S, E78K et K140T, respectivement dans les boucles C, D, E et G, entraînaient une diminution du courant induit par l'application d'Imidaclopride (Hikida et al, 2018). L'observation d'une variation d'affinité de liaison et de sensibilité en fonction des propriétés électrostatiques des acides aminés participant au site de liaison permet de mieux comprendre le fonctionnement des nAChRs vis-à-vis d'insecticide. Il a été montré que certains insectes exprimaient des nAChRs possédant un seul site de liaison à l'Imidaclopride alors que d'autres insectes exprimaient des nAChRs ayant un site à haute affinité et un site à basse affinité.

Des sites avec des affinités différentes ont été retrouvés principalement chez les insectes piqueur-suceurs de la famille des hémiptères et sont absents chez les insectes non hémiptères (Crossthwaite et al, 2017; Taillebois et al, 2018). L'observation de site à haute affinité chez les insectes hémiptères pourrait expliquer l'efficacité particulière du contrôle de ces ravageurs de culture par l'utilisation d'Imidaclopride. Cependant, cette observation n'est pourtant pas retrouvée chez tous les hémiptères. Des mutations pouvant induire une perte du site à haute affinité entraînent une résistance accrue à l'Imidaclopride. C'est le cas du puceron *Myzus persicae*. Par exemple, la mutation R81T de la sous-unité nicotinique $\beta 1$ retrouvée dans la souche de pucerons FRC, résistante à l'Imidaclopride, semble entraîner la disparition du site de fixation à haute affinité pour cet insecticide (Bass et al, 2011).

Chapitre 3 : Effet des insecticides sur la physiologie des insectes

1. Mécanismes de résistance

L'utilisation importante et non raisonnée des insecticides en agriculture a fait émerger des mécanismes de résistances aux insecticides chez les insectes ravageurs de culture. En effet, les insecticides amènent une pression de sélection extrêmement forte sur les insectes exposés (Mallet, 1989; Denholm, 2002; Borel, 2017). La première résistance avérée à l'Imidaclopride date de 1995 avec la découverte en Espagne, dans la région d'Almeria, d'aleurode du tabac, *Bemisia tabaci*, résistant à l'Imidaclopride. Cette résistance s'est déclarée seulement 4 ans après l'autorisation de mise sur le marché de cet insecticide (Cahill et al, 1996). Il est intéressant de remarquer que cette première résistance rapportée pour l'Imidaclopride, un agoniste des nAChRs, intervient chez un insecte s'étant déjà adapté à l'exposition d'un agoniste nicotinique ayant un effet insecticide : la nicotine. Il s'avère, dans ce cas, que la capacité de résistance à la nicotine de *Bemisia tabaci* semble favoriser l'apparition rapide d'une résistance à l'Imidaclopride. La résistance de certains insectes aux produits allélochimiques des plantes pourrait être à l'origine des résistances observée vis-à-vis des insecticides synthétiques utilisés aujourd'hui en agriculture (Alyokhin et Chen, 2017). Les origines de ces résistances aux insecticides peuvent être de natures diverses. Cette partie a pour but de décrire succinctement les 4 types différents de mécanismes de résistance mis en place par les insectes.

1.1 Comportement d'évitement

La résistance comportementale des insectes est souvent associée à un comportement d'évitement ayant comme origine une aversion apprise par l'insecte ou une répulsion induite par la molécule à effet insecticide, aboutissant ainsi à limiter l'exposition de l'insecte à un insecticide (Zalucki et Furlong, 2017). La décision prise par l'insecte de se nourrir passe en premier lieu par la capacité à détecter visuellement, olfactivement ou par contact la présence d'un composé toxique (Després et al, 2007). La modification de comportement peut, dans certains cas, être corrélée à la modification d'éléments impliqués dans la détection de l'insecticide. Selon Zalucki (2017), le meilleur exemple de modification comportementale entraînant une diminution de l'efficacité d'un insecticide provient d'une étude réalisée sur des blattes germaniques (Wang et al, 2004; Zalucki et Furlong, 2017). Il a été montré que certaines blattes évitaient la consommation d'appâts intoxiqués à l'Imidaclopride. L'aversion pour ces appâts ne proviendrait pas de l'Imidaclopride en elle-même, mais plutôt des attractants (glucose, maltose, fructose et sucrose) contenus dans l'appât (Wang et al, 2004). Selon certains auteurs (Wada-Katsumata et al, 2013), ceci pourrait provenir d'une altération de la réponse au sucre passant par des neurones gustatifs exprimant des récepteurs modifiés, changeant ainsi l'appétence pour le sucre en aversion. Les blattes possédant ce récepteur modifié éviteraient la consommation d'appât. Il a également été montré chez les pucerons *Myzus nicotinae* et *Myzus persicae*, respectivement

résistant et sensible à l'Imidaclopride, une altération du comportement alimentaire (Nauen et Elbert, 1997). Dans un premier temps, les 2 espèces montraient un évitement des feuilles traitées à l'Imidaclopride et ne s'en nourrissaient pas. On peut affirmer que dans cette expérience la détection de l'Imidaclopride par les pucerons les incite à ne pas s'intoxiquer. Cette observation est à mettre en parallèle avec un autre phénomène qui est la capacité à résister à la privation de nourriture chez ces 2 espèces. Tandis que 50% des pucerons de la souche sensible mouraient après 38h de privation de nourriture, 50% des pucerons de la souche résistante mouraient au bout de 58h de privation. Le comportement d'évitement couplé à une tolérance accrue à la privation alimentaire permettait donc à ces pucerons de mieux résister à l'Imidaclopride pour une période donnée. De plus, il semblerait que cette habitude alimentaire soit réversible et puisse être perdue après plusieurs mois d'élevage en laboratoire (Nauen et Elbert, 1997). Ce comportement d'évitement est un comportement potentiellement transmissible. Une étude sur des mouches domestiques (*Musca domestica*) soumises à une exposition d'Imidaclopride et sélectionnées selon leur capacité de résistance à ce dernier sur plusieurs générations a montré que les mouches sélectionnées ont une résistance 331 fois plus importante que les mouches sauvages, et ceci en seulement 5 générations (Seraydar et Kaufman, 2015). Il est évident que le comportement n'est pas la raison primaire d'une résistance à un insecticide. Mais on peut raisonnablement penser qu'il participe activement à la sélection d'insectes exprimant une fuite vis-à-vis d'un insecticide. Ce comportement permet de limiter l'exposition des insectes aux insecticides. Néanmoins, ces modifications de comportements induites par une exposition à l'Imidaclopride ne s'opèrent pas systématiquement dans ce sens et il est possible d'observer une préférence pour cet insecticide. En 2015, une étude portant sur le comportement d'abeilles exposées à des doses sublétales d'Imidaclopride présentes dans une solution sucrée a permis de mettre en évidence un changement dans les habitudes de butinage (Kessler et al, 2015). Les abeilles soumises à un test de choix entre des solutions témoins et des solutions contenant des néonicotinoïdes étaient, dans un premier temps, attirées par les solutions toxiques. L'étude électrophysiologique des neurones d'abeilles exprimant des récepteurs gustatifs au niveau des pièces buccales a montré que les différents insecticides n'altéraient en rien la réponse gustative des abeilles pour le sucre. La préférence observée n'était donc pas en lien avec une modification du goût par les néonicotinoïdes (Kessler et al, 2015). Malgré ce choix pour les solutions toxiques, la quantité totale de nourriture ingérée par les abeilles était globalement diminuée, impactant ainsi leurs taux de survie à long terme. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la brève exposition à des néonicotinoïdes avait un impact sur la mémoire et l'apprentissage olfactif des abeilles aboutissant ici à une préférence et non à un évitement. En effet, les nAChRs exprimés dans les structures impliquées dans la mémoire et l'apprentissage, telles que les corps pédonculés et les lobes olfactifs, seraient activés par ces faibles doses d'insecticides et perturberaient la prise de décisions des abeilles.

1.2 Épaississement de la cuticule

Il a été montré que les organismes exposés à des insecticides avaient la capacité d'augmenter l'épaisseur de leur cuticule. Cet épaississement permet de limiter la quantité d'insecticide capable de pénétrer dans leur organisme ou augmente le temps nécessaire pour qu'il puisse pénétrer. En effet, la rétention de la molécule insecticide se fait en interaction avec les protéines structurales constituant la cuticule. Le maillage ainsi créé ralentira la vitesse de pénétration de l'insecticide. À cela, s'ajoute la présence d'enzyme de détoxification dans la cuticule permettant de dégrader l'insecticide (Puinean et al, 2010). La modification de la composition de la cuticule se traduit par la surexpression de protéines qui participent à la formation de la cuticule. Ce mécanisme de résistance a été décrit chez beaucoup d'espèces d'insectes pour une large gamme d'insecticide (Balabanidou et al, 2018). Il semblerait que cette résistance fonctionnerait comme une première barrière de défense efficace, voire privilégiée par certains insectes, face aux insecticides. La comparaison des niveaux d'expression de transcrits codants pour des protéines cuticulaires chez 2 souches de pucerons *Myzus persicae*, dont l'une est résistante et l'autre sensible aux néonicotinoïdes (Imidaclopride, Clothianidine, Thiaméthoxame et Thiaclopride), a montré que 32 protéines cuticulaires étaient différentiellement exprimées. L'expression de ces 32 transcrits est entre 2,2 et 11,1 fois plus importante pour la souche de pucerons résistants aux néonicotinoïdes. Ces transcrits surexprimés font partie de la famille des protéines cuticulaires possédant les motifs consensus de Rebers-Riddiford permettant la liaison à la chitine (Rebers et Riddiford, 1988) ainsi que des protéines riches en glycine (ex : ACP-20, soie, élastine et collagène) (Charles et al, 1992; Zhang et al, 2008; Puinean et al, 2010). De plus, l'application topique de néonicotinoïdes sur ces 2 souches de pucerons a permis d'évaluer des ratios de résistance de 27, 30, 30 et 41 pour l'Imidaclopride, la Clothianidine, le Thiaméthoxame et le Thiaclopride, respectivement, chez la souche résistante. De plus, l'inhibition des enzymes de détoxification par le pipéronyle butoxyde ne permet d'observer qu'un retour partiel de sensibilité aux néonicotinoïdes de la souche résistante. Ainsi, la résistance aux néonicotinoïdes est liée en partie à la modification de la composition protéique de la cuticule chez la souche résistante. Cette adaptation des insectes permet une résistance à de nombreux insecticides, en particulier ceux utilisés en pulvérisation dans les champs.

1.3 Résistance métabolique

Cette forme de résistance est l'une des plus anciennement décrites. Les résistances au DDT qui avaient été observées dès 1951 par Busvine sur des mouches domestiques en Italie et en Sardaigne mettaient en jeu des mécanismes inconnus et des mécanismes de déshydrochlorination (Busvine, 1951). Aujourd'hui, nous savons que cette résistance, appelée résistance métabolique, est la conséquence d'enzymes particulières participant à la détoxification de xénobiotiques. Ces enzymes dégradent les xénobiotiques présents dans l'organisme de l'insecte. Ceci a pour conséquence de diminuer la quantité d'insecticide capable d'interagir avec

ses cibles moléculaires. La surexpression constitutive de ces enzymes ou l'augmentation de leur activité seront alors des éléments clés dans la capacité de résistance d'un insecte face à un insecticide. Les enzymes de détoxification les plus étudiées sont les cytochromes P450, les glutathion S-transférases et les estérases (Hemingway et Ranson, 2000; Enayati et al, 2005; Li et al, 2007; Montella et al, 2012). Ces 3 classes d'enzymes possèdent des activités enzymatiques différentes permettant ainsi d'agir sur un large panel d'insecticide. Les réactions chimiques catalysées par ces enzymes peuvent être séparées en 2 phases pendant lesquelles on observe l'implication d'enzymes particulières. La phase I correspond au premier élément de l'organisme capable d'agir sur un xénobiotique. Celui-ci met en jeu majoritairement des cytochromes P450 et, dans une moindre mesure, des estérases. Le rôle de ces enzymes est de favoriser la biotransformation d'un xénobiotique toxique en un métabolite potentiellement moins toxique. Néanmoins, il est possible que certains métabolites de dégradations soient plus toxiques que la molécule initiale telle l'oléfine pour l'Imidaclopride ou le DCJW pour l'Indoxacarbe. Les réactions catalysées par les enzymes de phase I peuvent être des oxydo/réductions, des hydrolyses, des hydroxylations, des déshalogénations voire un clivage oxydatif de la molécule. La métabolisation des xénobiotiques au cours de cette phase produit des métabolites intermédiaires légèrement plus polaires et solubles dans l'eau. Ces métabolites intermédiaires sont alors pris en charge par des enzymes de détoxification de phase II. Cette phase correspond à une conjugaison de ces métabolites avec une molécule endogène par une enzyme de conjugaison. Les enzymes de détoxification de phase II vont catalyser l'ajout d'une molécule endogène aux métabolites secondaires de phase I. Le but de cette conjugaison est d'augmenter la solubilité de la molécule afin qu'elle soit excrétée de l'organisme (Liska, 1998) (Figure 23).

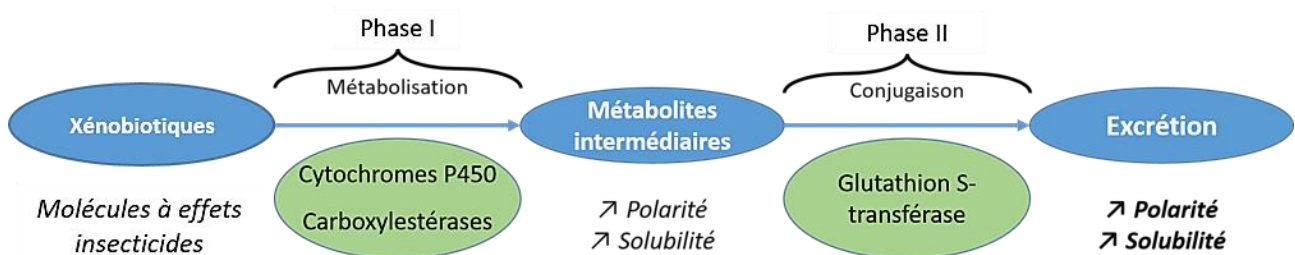


Figure 23. Représentation schématique des phases de dégradation des xénobiotiques impliquant des enzymes de détoxification.

Les cytochromes P450 sont des enzymes ayant une activité enzymatique monooxygénase. La superfamille des cytochromes P450 est extrêmement diversifiée, aussi bien génétiquement que par les substrats qu'elles métabolisent. Les résistances métaboliques associées au cytochrome P450 ont été rapportées pour toutes les classes d'insecticides connues et mettent en jeu de nombreux gènes CYP codants pour ces enzymes (Li et al, 2007). Il a été montré, par l'utilisation de pipéronyle butoxyde (PBO), un inhibiteur des cytochromes P450, que les cytochromes P450 participent à la détoxification de l'Imidaclopride chez les insectes (Zewen et al, 2003). La surexpression des gènes CYP6ER1, CYP6AY1, CYP6CW1, CYP4CE1 chez *Nilaparvata lugens*, CYP353D1v2 chez *Laodelphax striatellus* a été mise en évidence chez des souches résistantes à

l'Imidaclopride. L'identification des gènes de cytochromes P450 précisément impliqués dans la détoxification de l'Imidaclopride reste encore difficile à l'heure actuelle de par la grande diversité génétique de ces enzymes (Bass et Field, 2011; Elzaki et al, 2016; Zhang et al, 2016).

Les estérases sont des enzymes qui clivent les liaisons ester des insecticides (Sogorb et Vilanova, 2002; Montella et al, 2012). Ce type d'enzyme participe à la résistance métabolique vis-à-vis des organophosphates, des pyréthriinoïdes et des carbamates. Comme pour les cytochromes P450, les estérases vont métaboliser le xénobiotique afin de le rendre moins toxique pour l'organisme. De plus, la métabolisation de l'insecticide va augmenter sa polarité et donc sa solubilité. Les estérases ne semblent pas participer à la dégradation de l'Imidaclopride car ce dernier ne possède pas de liaisons ester (R-COO-R'). Enfin, les glutathion S-transférases sont des enzymes de détoxification de phase II. Elles diffèrent des enzymes de phase I de par le type de réaction chimique qu'elles favorisent. En effet, ces dernières ne catalysent pas une hydroxylation ou un clivage, mais favorisent une réaction de conjugaison entre le xénobiotique ou un de ses métabolites avec un conjugué : le glutathion. La conjugaison va alors grandement augmenter la polarité de la molécule et donc sa solubilité. Le rôle du glutathion est donc de favoriser l'excrétion d'un xénobiotique afin de l'éliminer le plus rapidement possible. Il a aussi été montré que les glutathion S-transférases pouvaient avoir une activité enzymatique de déshydrochlorination. Cette propriété l'impliquerait dans la résistance métabolique liée à l'insecticide DDT (Zimniak et al, 2003; Enayati et al, 2005). Il est possible de résumer l'implication de chaque enzyme dans les phases de détoxification comme étant un enchaînement de réactions enzymatiques conduisant le xénobiotique de départ à être i) moins toxique pour l'organisme et ii) excréter de l'organisme. Cette étude portant sur l'insecticide Imidaclopride, il a été illustré une des voies possibles de détoxification de cet insecticide dans la Figure 24.

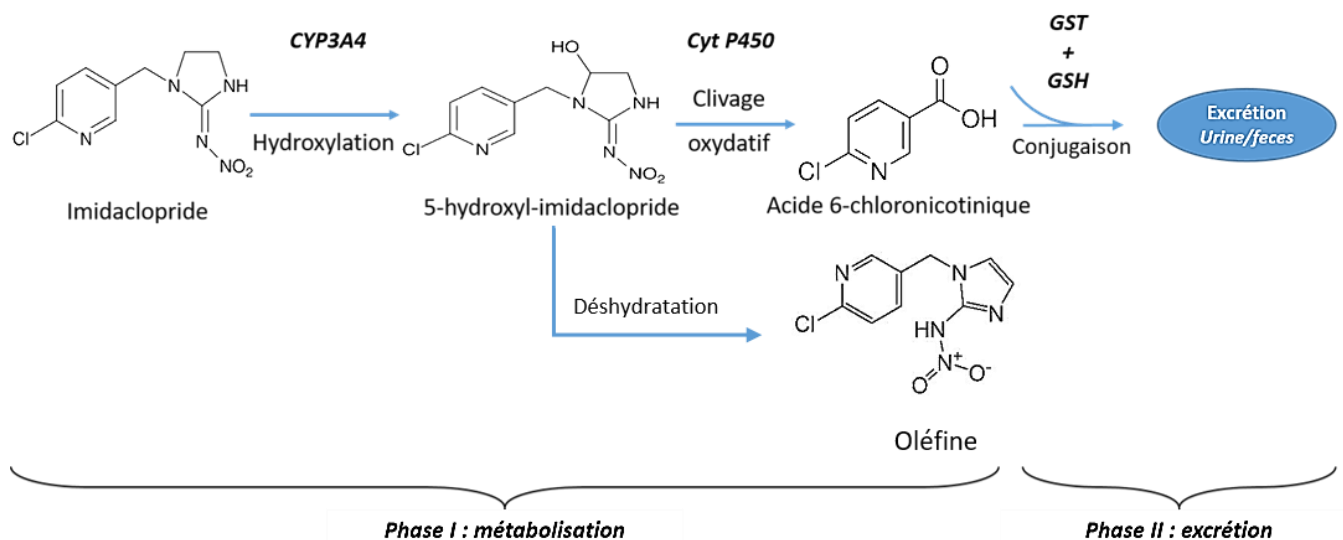


Figure 24. Une des nombreuses voies de détoxification possible de l'Imidaclopride.

La voie de métabolisation présentée n'est pas la seule existante, mais met en lumière les métabolites secondaires couramment obtenus. Il est intéressant de noter que l'une des voies de métabolisation de l'Imidaclopride conduit à la formation d'un composé appelé oléfine. Ce composé a une toxicité nettement supérieure à celle de l'Imidaclopride (Suchail et al, 2001).

1.4 Modification des cibles aux insecticides par des mutations ponctuelles

En 2005, une mutation a été découverte chez une souche de cicadelle brune, *Nilaparvata lugens*, lui conférant une très grande résistance à l'Imidaclopride. Cette souche a été sélectionnée avec de l'Imidaclopride pendant plusieurs générations (Zewen et al, 2003). Au bout de 25 générations sous pression sélective, le ratio de résistance était de 73. En continuant la sélection, il a été mesuré un ratio de résistance de 250 à la 35^{ème} génération. Deux mutations communes à ces 2 populations ont été retrouvées sur les sous-unités nicotiniques $N\alpha1$ et $N\alpha3$. Ces 2 mutations sont absentes chez la souche sensible. Cette mutation était le remplacement d'une tyrosine par une sérine en position 151 (Y151S), située dans la boucle B des sous-unités nicotiniques $N\alpha1$ et $N\alpha3$. Cette mutation est responsable d'une réduction de l'affinité entre l'Imidaclopride et le site de fixation pour cet agoniste (Liu et al, 2005, 2006; Zhang et al, 2009). En 2011, pour la première fois, une mutation a pu être observée sur des pucerons *Myzus persicae* prélevés dans l'environnement (Bass et al, 2011). La mutation est portée par la sous-unité nicotinique identifiée comme étant $Mp\beta1$. La mutation observée est le remplacement d'une arginine par une thréonine en position 81 (R81T) et confère une forte résistance du puceron à l'Imidaclopride. Cette mutation dans la boucle D a eu comme conséquence la perte d'un des deux sites de fixation à l'Imidaclopride que l'on retrouve chez *Myzus persicae* (Lind et al, 1998). De plus, seule la sous-unité $Mp\beta1$ présentait une mutation dans la souche résistante alors que les séquences protéiques des sous-unités α $Mp\alpha1$, $Mp\alpha2$, $Mp\alpha3$, $Mp\alpha4$ et $Mp\alpha5$ étaient identiques entre la souche sensible et la souche résistante. Cette étude a permis de comprendre le rôle que peuvent jouer les sous-unités β dans la sensibilité à l'Imidaclopride. Cette modification des cibles moléculaires par mutation n'est pas la seule responsable d'un mécanisme de résistance. Il est possible d'observer des événements d'éditions d'ARN ou d'épissages alternatifs contribuant à une diminution de la sensibilité à l'Imidaclopride (Raymond et al, 2017). Le mécanisme d'édition impliqué dans la modification de la sensibilité à l'Imidaclopride a été caractérisé plus précisément chez la cicadelle brune *Nilaparvata lugens* (Yao et al, 2009). En effet, l'édition de la sous-unité $\beta1$, qui modifie une asparagine en acide aspartique en position 133 (N133D), est retrouvée de manière plus fréquente dans une population résistante à l'Imidaclopride. De plus, une expérience de mutagenèse dirigée cherchant à mimer cette édition dans la sous-unité $\beta2$ de rat a montré que le récepteur hybride $N\alpha1/\beta2^{N133D}$ présentait une légère diminution de sensibilité pour l'Imidaclopride. La modification des cibles peut prendre la forme d'un changement dans la stœchiométrie des sous-unités exprimées (Raymond et al, 2017). C'est le cas pour la blatte *Periplaneta americana* (Benzidane et al, 2017) et le moucheron *Bradysia odoriphaga* (Shan et

al, 2020), chez lesquels la modification d'expression des sous-unités nicotiques $Pa\alpha 1$ et $Pa\alpha 2$ ou $Bo\alpha 1$ et $Bo\beta 1$ était corrélé, respectivement, à une diminution de sensibilité cellulaire et une résistance à l'Imidaclopride.

2. Doses sublétales et phénomènes d'accommodation

2.1. Persistance et devenir de l'Imidaclopride dans l'environnement

La persistance de l'insecticide dépendra de ses propriétés physico-chimiques, de sa dispersion dans l'environnement et de sa dégradation biotique ou abiotique au cours du temps (Bonmatin et al, 2015). La dilution spatiale de l'insecticide se fait, potentiellement, par un gradient de concentration. Ce gradient a pour origine les zones traitées et s'étend vers des environnements plus éloignés par l'action d'éléments géologiques ou météorologiques. Cette dispersion peut se faire par les vents lors du traitement des champs (épandage, semis, nébulisation) et fait l'objet de pratiques particulières afin de limiter cette dispersion. Par exemple, le traitement des cultures peut se faire après le coucher du soleil, en absence de vent, avec la prise en compte du phénomène d'inversion des températures au petit matin et en dehors de la période de floraison. Ces précautions limitent le dépôt de gouttelettes en dehors de la zone traitée (Enz et Hofman, 2017). Les propriétés physico-chimiques jouent également un rôle important. La solubilité d'un insecticide va conditionner sa capacité à être dispersé, en particulier lors d'un lessivage par la pluie ou l'arrosage des cultures. L'insecticide pourra alors soit s'infiltrer en profondeur et atteindre le réseau aquifère ou les nappes phréatiques de la zone traitée. Il peut également être drainé de cette zone par des phénomènes de ruissellement et ainsi se retrouver dilué dans les cours d'eau. L'insecticide est alors dispersé loin de son point d'application. La dilution temporelle fait intervenir des éléments biotique et abiotique. Les insecticides, comme l'Imidaclopride, utilisés en plein champ sont soumis aux rayons solaires (UV) qui vont alors le dégrader en différents métabolites tels que l'aldéhyde 6-chloronicotinique, le 6-chloro-N-methylnicotinamidamide et l'acide 6-chloronicotinique (Scholz et Reinhard, 1999; Krohn et Hellpointner, 2003) qui peuvent être plus ou moins toxiques pour les ravageurs de culture et les organismes non-cibles. L'adsorption de l'insecticide sur la matière organique est un phénomène physico-chimique permettant de séquestrer durablement l'insecticide. Cette adsorption va alors artificiellement retirer l'insecticide de l'environnement en le rendant bio-indisponible, que cela soit pour les ravageurs de culture ou les organismes non-cibles. Ce phénomène dépend grandement de l'insecticide en lui-même ainsi que de son état physico-chimique lorsqu'il est présent dans le sol. En effet, l'acidité du sol, l'état hydrique, la température et la présence de matière organique sont autant d'éléments qui conditionneront le devenir de l'insecticide dans l'environnement. Enfin, l'insecticide peut se retrouver dégrader activement par les communautés bactériennes contenues dans le sol. Ces bactéries, peuvent dégrader l'insecticide en l'utilisant alors comme source de carbone (Sabourmoghaddam et al, 2015). Ces différents phénomènes participent à la diminution de l'insecticide dans l'environnement. Néanmoins, ces processus ne

sont pas immédiats, les insecticides utilisés pourront alors être présents dans l'environnement à très faible concentration pendant une durée plus ou moins longue. On peut prendre en exemple le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) dont l'utilisation a été interdite dans les années 1970 et dont on retrouve actuellement des traces de contamination chez des espèces vivant en Antarctique (Strobel et al, 2016, 2018; Ellis et al, 2018; Bhardwaj et al, 2019). De plus, il a été enregistré des pics de concentration en DDT chez ces mêmes espèces au milieu des années 1980 (Ellis et al, 2018), soit 15 ans après son interdiction. Cette situation extrême de dispersion spatio-temporelle permet de mieux comprendre la présence d'insecticides à des doses infimes dans l'environnement.

Dans le cas de l'Imidaclopride, la rémanence, présumée faible en conditions contrôlées ($t_{1/2} = 57$ min par photolyse) (Gervais et al, 2010), s'avère être variable lorsque des paramètres tels que le taux d'humidité dans les sols, l'acidité des sols, la température, l'ensoleillement sont pris en compte. La rémanence peut alors augmenter, allant jusqu'à plusieurs années pour des doses mesurables d'Imidaclopride (Cox, 2001; Bonmatin et al, 2015). De plus, il a été montré que l'utilisation d'Imidaclopride au fur et mesure des années induisait une accumulation de celui-ci. Ce phénomène peut s'expliquer par des temps de demi-vie fluctuant en fonction des conditions environnementales. Pour atteindre moins de 1% de molécules initiales, il est admis d'attendre 7 cycles de demi-vie (Gervais et al, 2010). Il a été trouvé que ce temps de demi-vie pouvait varier fortement, allant de 28 à 46 jours en Inde (Sarkar et al, 2001) dans la région du Bengale, de 107 jours à plus d'un an aux États-Unis (Cox, 2001) (Minnesota, Géorgie, Alabama et Californie) et plus de 1250 jours au Royaume-Unis pour un cas particulier (Goulson, 2013). La persistance d'un insecticide dans l'environnement selon les éléments vus précédemment permet de comprendre que sa répartition dans l'environnement peut-être très hétérogène. Par conséquent, les insectes se retrouvent exposés à des doses plus ou moins élevées en fonction de leur milieu de vie (i.e. aérien, souterrain, aqueux), de leur mode de nutrition (i.e. piqueur-suceurs, suceurs, détritivores, carnivores, broyeurs) ou de leurs positions dans la chaîne alimentaire. Les doses auxquelles sont exposés ces insectes peuvent être très faibles, elles sont dites sublétales, et n'entraînent pas de mortalité immédiate. L'absence d'effet observable ne signifie pas pour autant que ces doses n'ont pas d'effet sur la physiologie générale des insectes à plus ou moins long terme.

2.2. Mécanismes d'accommodation

Les organismes exposés aux insecticides peuvent répondre par des mécanismes d'accommodation leur permettant de minimiser l'effet de l'insecticide sur leur physiologie. Ces mécanismes d'accommodation peuvent être retrouvés à l'échelle de la physiologie générale de l'insecte, mais aussi au niveau cellulaire et moléculaire avec la modification des niveaux d'expressions de gènes particuliers. Enfin, ces différents mécanismes en réponse à une

exposition à des doses sublétales peuvent potentiellement être transmis aux générations suivantes *via* l'héritabilité épigénétique (D'Urso et Brickner, 2017).

2.2.1. *Modification de la physiologie générale des insectes par une exposition à une dose sublétale d'insecticide*

L'exposition des insectes à de fortes doses d'insecticides se traduit par l'observation d'effets négatifs sur un organisme. Néanmoins, il est aussi possible d'observer une amélioration des performances pour certaines fonctions biologiques lorsque l'organisme est exposé à des doses sublétales. L'effet des insecticides est donc biphasique et se traduit par une courbe en forme de U lorsque le dysfonctionnement d'un paramètre physiologique est mesuré en fonction de la dose d'insecticide (Figure 25).

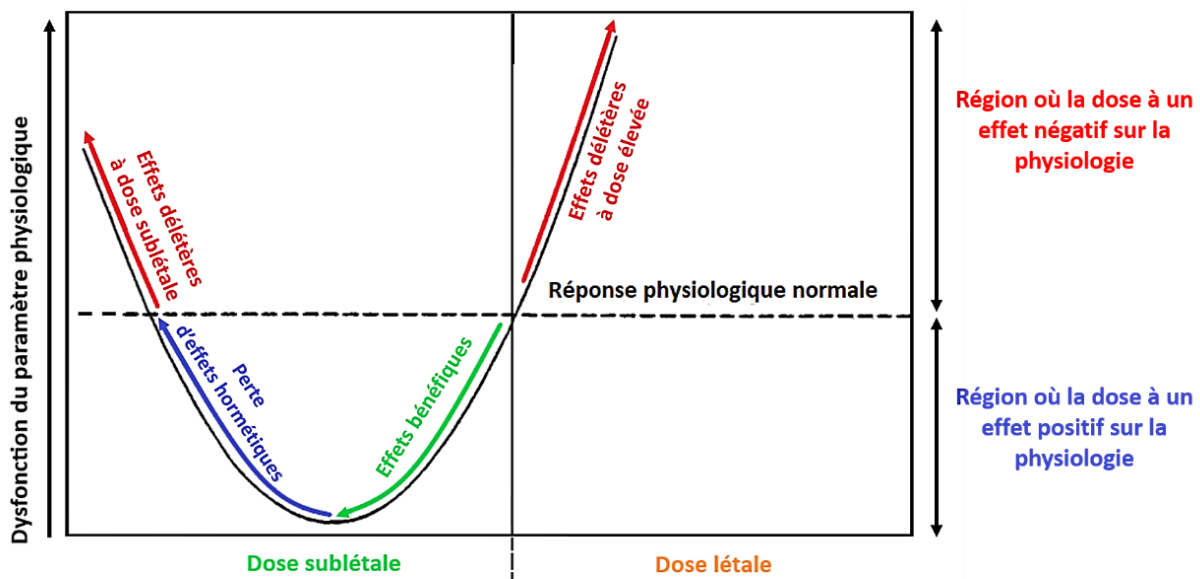


Figure 25. Représentation schématique de la courbe en forme de U caractéristique de l'effet biphasique des insecticides sur la physiologie des insectes. Modifiée d'après Calabrese et Baldwin, 2001.

Cette réponse particulière d'un organisme est appelée hormèse et a été définie par Cutler et Guedes comme étant « l'inhibition d'un phénomène biologique à haute dose et d'une stimulation de ce même processus biologique pendant ou après l'exposition à une faible dose d'une molécule considérée comme toxique » (Cutler et Guedes, 2017). Il a d'ailleurs été montré que certaines fonctions biologiques telles que la reproduction, la croissance (Xu et al, 2016), la fertilité (Zhao et al, 2018) ou le succès reproducteur (Lalouette et al, 2016) pouvaient être améliorés, chez certains insectes, par des doses sublétales d'insecticides. De plus, la stimulation précoce du système de détoxification par une dose sublétale d'insecticide permet de réduire les effets négatifs d'un stress oxydatif auxquels l'insecte peut être exposé durant son existence (Rix et al, 2016). À l'inverse, il est aussi possible d'observer des effets négatifs de ces faibles doses sur la physiologie de certains insectes auxiliaires. Une diminution de la fertilité, de la longévité et des

capacités de parasitage d'une guêpe parasitoïde, *Aphidius gifuensis*, exposée à des doses sublétales d'Imidaclopride a été observée (Kang et al, 2018). Le comportement peut aussi être affecté chez le bourdon *Bombus terrestris*, qui, lorsqu'il est exposé à une dose faible d'Imidaclopride, diminue son activité de butinage de 31%, aboutissant à une diminution globale de la performance de la ruche (Feltham et al, 2014).

2.2.2. Modifications cellulaires et moléculaires induites par une exposition des insectes à une dose sublétale d'insecticide

Les altérations physiologiques et comportementales induites par des doses sublétales d'insecticides ont principalement comme origine une modification des niveaux d'expression de gènes impliqués dans les diverses fonctions biologiques. L'augmentation du succès reproducteur observé chez la noctuelle *Spodoptera littoralis* serait due à une modification de l'expression de gènes impliqués dans la détoxification, dans la réponse au stress et dans les processus d'olfaction nécessaire à la réponse aux phéromones sexuelles (Lalouette et al, 2016). La dynamique de réponse aux phéromones sexuelles serait accélérée chez les mâles exposés à de faibles doses de Deltaméthrine et permettrait ainsi de déclencher plus rapidement la parade nuptiale, augmentant ainsi le succès reproducteur. Cependant, l'accommodation d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme à une dose sublétale d'insecticide fait intervenir un ensemble de gènes interagissant entre eux. L'étude du transcriptome des insectes exposés à des doses sublétales de néonicotinoïdes permet alors de dresser une liste exhaustive de gènes différentiellement exprimés potentiellement impliqués dans ces mécanismes d'accommodation (Wang et al, 2015; Wu et al, 2017; Shi et al, 2017; Christen et al, 2018). Les insecticides ciblant majoritairement des éléments neuronaux tels que les récepteurs et les canaux ioniques, il paraît logique que l'accommodation des insectes passe par une modification des niveaux d'expressions de ces cibles ainsi que de leurs éléments de régulations. Par exemple, on peut noter dans l'étude de Christen et collaborateurs (Christen et al, 2018), que la phosphodiesterase spécifique de l'AMPC/GMPc et dépendante du complexe calcium/calmoduline (PDE1A) est sous exprimée dans le cerveau d'abeilles exposées à une dose sublétale d'Imidaclopride. Or, l'AMPC et le GMPc interviennent comme second messager dans la régulation de récepteurs nicotiques (Courjaret et Lapied, 2001; Mannai et al, 2016). Dans l'étude de Wu (2017), on retrouve, entre autres, une augmentation de l'expression du transcrite de la sous-unité $\alpha 7$ dans des têtes d'abeilles exposées à l'Imidaclopride (Wu et al, 2017). De même, il a été retrouvé des gènes différentiellement exprimés impliqués dans les voies de signalisation telles que la protéine kinase de type C, la sérine/thréonine kinase PLK1-like ou la MAPKKK4 (Wu et al, 2017). L'exemple le plus marquant, ayant permis d'orienter ces travaux de thèse, a été la modification des niveaux d'expression de sous-unités nicotiques Pa $\alpha 1$ et Pa $\alpha 2$ dans des ganglions de blattes exposées à une dose sublétale d'Imidaclopride. Ces sous-unités participent à la formation des récepteurs de sous-type nAChR2 qui sont insensibles à l'Imidaclopride. La variation d'expression des sous-unités Pa $\alpha 1$ et Pa $\alpha 2$ dans ce tissu s'est traduit par une diminution de la sensibilité à l'Imidaclopride d'une population de neurones spécifiques chez la blatte *Periplaneta americana* (Benzidane et al,

2017). À l'image des résultats obtenus pour les sous-unités nicotiniques et leurs éléments de régulations, il a été retrouvé des protéines auxiliaires de récepteurs nicotiniques pouvant être différentiellement exprimés lors d'une exposition sublétales à un insecticide. On peut citer par exemple les protéines interagissant avec les nAChRs telles que RIC-3, l'ubiquilin-1, PICK1, la synaptotagmine ou la protéine 14-3-3 qui étaient surexprimées chez le criquet migrateur, *Locusta migratoria*, exposé à de faibles doses d'Imidaclopride (Wang et al, 2015).

2.3. Transmission des modifications cellulaires et physiologiques par des phénomènes épigénétiques

Récemment, il a été abordé le caractère héréditaire de ces modifications induites par une exposition sublétales d'insecticides (Brevik et al, 2018). Il semblerait que les modifications de la physiologie ou des traits d'histoire de vie des insectes puissent être transmises de génération en génération par des mécanismes génétiques et/ou épigénétiques. L'apparition rapide d'organismes moins sensibles aux insecticides pourrait être expliquée par les mécanismes d'accommodation induits par une exposition à une dose sublétales d'insecticide couplés à une transmission épigénétique de ces modifications capables d'augmenter la fitness d'un individu puis d'une population entière. Ceci permettrait alors d'augmenter sensiblement la taille d'une population accommodée à un ou plusieurs insecticides et ainsi augmenter la probabilité d'apparition d'une mutation avantageuse sur un gène cible. Les mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, la transmission d'ARN non codants ou la modification d'histones peuvent participer à la transmission de traits physiologiques particuliers (Allis et Jenuwein, 2016; Denzler et al, 2016; Zhang et al, 2018). On peut prendre en exemple les phénomènes d'inhibition de déacétylation des histones chez l'abeille *Apis mellifera* ou la méthylation de l'ADN chez le moustique *Aedes albopictus* qui ont permis de rendre ces insectes résistants à l'Imidaclopride (Oppold et al, 2015; Hu et al, 2017). De plus, l'étude d'Oppold et collaborateurs (Oppold et al, 2015) met en évidence un effet transgénérationnel de la résistance à l'Imidaclopride induite par des agents de méthylation de l'ADN, la vinclozoline et la génistéine. Bien que seuls les parents aient été exposés à ces composés, les descendants jusqu'à la 2^{ème} génération ont montré des signes de résistance importants. La caractérisation des mécanismes d'accommodation induits par des doses sublétales d'insecticides ainsi que leur héritabilité permettrait d'apporter à la recherche scientifique un élément primordial dans la lutte contre les ravageurs de culture.

Chapitre 4 : Objectifs

L'étude préalable menée au laboratoire SiFCIR a démontré que l'exposition subchronique des blattes *P. americana* à une dose sublétales d'Imidaclopride induisait une modification de la sensibilité des neurones DUM à l'Imidaclopride (Benzidane et al, 2017). Les objectifs de ce travail de thèse sont : 1) de déterminer si ces modifications cellulaires sont capables de rendre les blattes moins sensibles à l'Imidaclopride, 2) d'étudier les principales modifications moléculaires et physiologiques induites par ce traitement et 3) de déterminer si ces modifications persistent après l'arrêt du traitement à l'Imidaclopride. La cible de l'Imidaclopride étant les récepteurs nicotiques (nAChRs), nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ces récepteurs et aux protéines pouvant réguler leur activité.

Cette étude qui a été réalisée sur la blatte *Periplaneta americana*, contribue au développement de nos connaissances des effets des doses sublétales sur les insectes et des mécanismes d'accommodation afin de pouvoir les prendre en considération dans les stratégies de lutte contre les insectes nuisibles.

Partie 2 : Matériels et méthodes

1. Modèle biologique : la blatte *Periplaneta americana*

La blatte américaine est un insecte long de 3 à 5 cm pesant en moyenne 0,7 g que l'on retrouve communément sur le continent américain, à des latitudes relativement chaudes. Elles vivent principalement dans des environnements très humides, riches en nourriture et à l'abri de la lumière (Bell et Adiyodi, 1982; Barbara, 2014). Par conséquent, elle cohabite souvent avec l'espèce humaine et est considérée comme une espèce nuisible car elle est potentiellement vectrice de maladie et allergisante (Rust et al, 1991; Fang et al, 2015). Cet organisme est utilisé depuis longtemps comme modèle biologique (Pitman, 1971).

1.1. Position phylogénétique

La blatte *Periplaneta americana* est un insecte appartenant à l'ordre des blattoptères (Blattodea) relativement ancien en termes d'évolution (Figure 26).

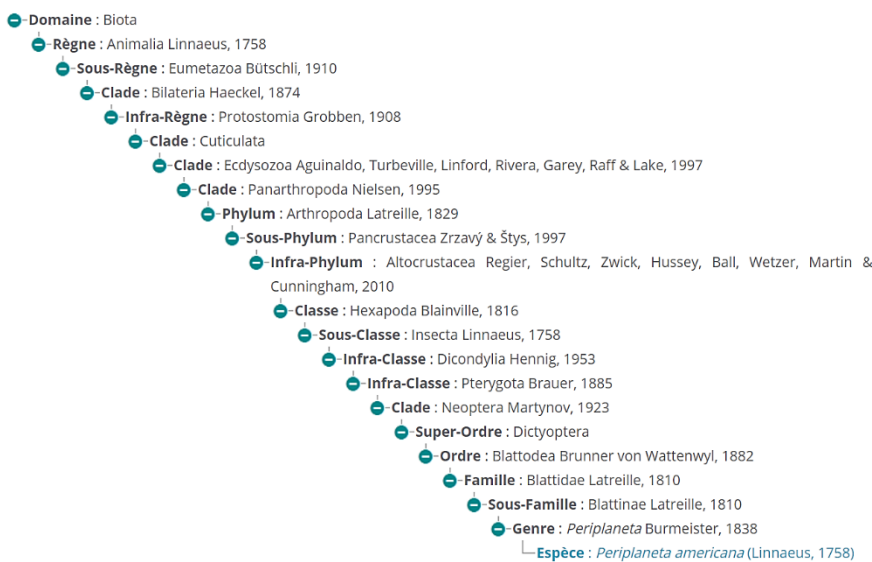


Figure 26. Classification phylogénétique de la blatte américaine *Periplaneta americana*. D'après l'Institut National du Patrimoine Naturel, (INPN), consulté en Juin 2020.

Des fossiles d'insectes possédant des synapomorphies de blatte ont été retrouvés dans des couches géologiques datant du début du Crétacé, soit il y a 140 millions d'années. Le superordre des Dictyoptères, apparu au Jurassique il y a 200 à 150 millions d'années, présentait déjà les caractéristiques particulières, partagées par les blattes et les termites d'aujourd'hui, d'être des omnivores détritvovores possédant un oviscapte réduit (Lo et al, 2000). Contrairement à ce que son nom latin laisse penser, la blatte américaine possède des origines africaines. En effet, des études de phylogénie moléculaire ont permis de situer cette espèce comme un groupe proche de *Shelfordella lateralis* (Kambhampati, 1995), une espèce de blatte native de la région située entre l'Afrique du Nord et l'Asie centrale. L'introduction de la blatte *Periplaneta americana* sur le

continent américain daterait du début du 16^{ème} (Li et al, 2018) durant la traite des esclaves (Bell et Adiyodi, 1982; Garcia, 2017) et le transport maritime.

1.2. Cycle de vie de la blatte *Periplaneta americana*

La blatte américaine est un insecte hétérométabole et plus précisément un paurométabole. Ainsi, son cycle évolutif se caractérise par une métamorphose progressive sans stade nymphal entre la larve et l'adulte (métamorphose incomplète). De plus, les larves et les adultes qui se ressemblent par leur conformation et leur mode de vie évoluent dans le même milieu (terrestre). Le développement de la blatte américaine comporte 3 stades : le stade œuf, le stade larvaire et le stade adulte (Figure 27). À l'état naturel, il se passe environ 600 jours entre le moment de la ponte de l'œuf et la métamorphose en adulte. Les adultes peuvent vivre jusqu'à 300 jours (Barbara, 2014). En laboratoire, il a été observé des femelles âgées de plus d'1 an et demi. Les oothèques pondues par la femelle dans un milieu riche en nutriment, humide et à l'abri de la lumière contiennent 14 à 16 œufs. L'éclosion de l'oothèque se fait 2 à 4 semaines après la ponte par l'émergence synchronisée de 14 à 16 larves de blattes (Figure 27A). L'accouplement se fait en opposition, à l'image des *Pyrrhocoris apterus*, et dure moins de 24h. Cet insecte est grégaire et vie en communauté dense sans pour autant avoir une hiérarchie particulière.

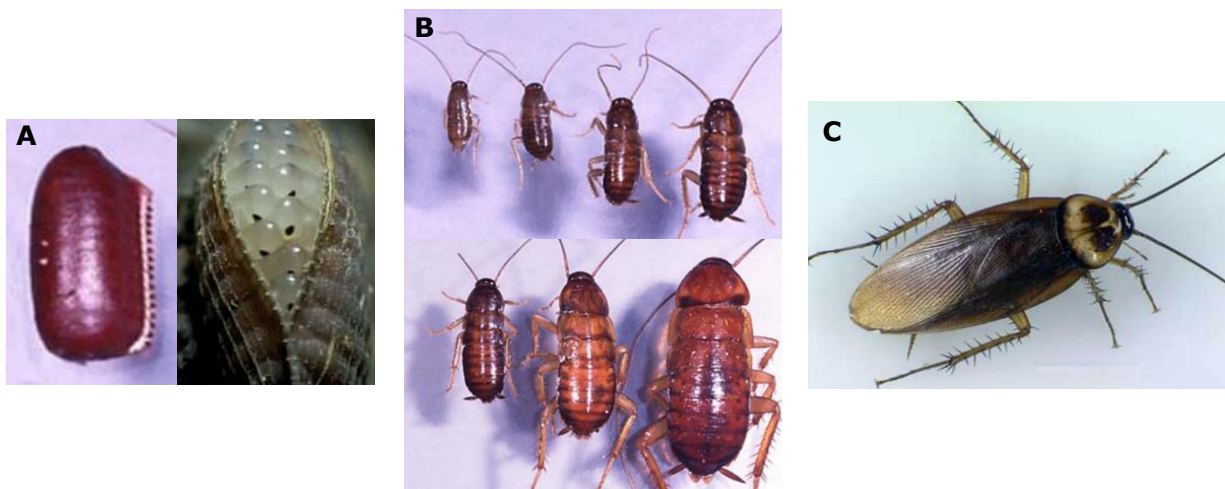


Figure 27. Photographies représentant les différents stades du cycle de vie de la blatte *Periplaneta americana*. A) Stade œuf : Oothèque contenant 14 à 16 œufs ; représentation d'une éclosion simultanée des œufs par le bourrelet chitineux de l'oothèque. B) Stade larvaire : Les larves passent par différents stades de croissance à travers des mues successives, jusqu'à 14 au maximum. La plus grosse larve est appelée L5 et précède la mue imaginale. C) Stade adulte : Blatte mâle ayant acquis ses ailes lors de la mue imaginale, photo de P.G. Koehler de l'Université de Floride. Modifiée d'après Barbara, 2014.

1.3. Élevage

L'élevage de cet insecte est réalisé au laboratoire SiFCIR à une température maintenue à 28°C avec une alternance des périodes de jour et nuit toutes les 12h. Chaque vivarium au sein de l'élevage possède entre 100 et 200 blattes adultes et de nombreuses larves. Il est important d'isoler régulièrement les adultes des larves car leur présence semble ralentir la croissance des juvéniles. De plus, des phénomènes de cannibalisme peuvent être observés lorsque la densité de blatte est importante. Les supports de pontes sont des boîtes à œuf qui permettent de fournir des abris et recoins nécessaires à l'oviposition tout en conservant un environnement humide. Les blattes sont nourries avec des aliments pour chien riches en protéine supplémentés régulièrement de lait en poudre. La consommation quotidienne en eau pour une blatte est d'environ 65 µL (évaluation personnelle sur 3 lots de 30 blattes mâles adultes pendant 3 semaines). Le mélange des populations de blattes est fait régulièrement entre les vivariums afin d'avoir un brassage génétique.

1.4. Avantages du modèle

L'utilisation de la blatte *Periplaneta americana* comme modèle biologique possède de nombreux avantages. Tout d'abord, son élevage, relativement facile, permet d'avoir une quantité importante de matériel biologique. Les blattes vivent dans des environnements nocifs pour d'autres organismes, car souvent riches en pathogènes et en toxines. La blatte possède donc des capacités d'adaptation lui permettant de s'adapter à un environnement inhospitalier tout en proliférant rapidement (Li et al, 2018). Par ailleurs, son système nerveux central (SNC) est utilisé depuis de nombreuses années dans la recherche scientifique pour étudier le mode d'action de molécules à effet insecticide (Lalonde et Brown, 1954; Pitman, 1971; Lane et al, 1982; Schroeder et Flattum, 1984; Stankiewicz et al, 2012; Holyoke et al, 2015; Cordova et al, 2016). Comme chez les autres insectes, le système nerveux central (SNC) de la blatte est constitué d'un cerveau (ganglions cérébroïdes) et d'une chaîne ganglionnaire ventrale segmentaire comprenant des ganglions sous-œsophagiens, thoraciques (pro-, méso- et métathoraciques) et abdominaux (de A1 à A6 également nommé Dernier Ganglion Abdominal [DGA]) (Figure 28A). À l'exception des ganglions cérébroïdes, chaque ganglion possède un type particulier de cellules neurosécrétrices, bien identifiées, appelées neurones dorsaux médians impairs (« Dorsal unpaired median » : DUM). Ces neurones sont ainsi nommés car ils sont situés au niveau de la zone médio-dorsale des ganglions (Watson, 1984), parce qu'ils sont issus d'une cellule souche impaire appelée « unpaired median neuroblast » (Goodman, 1982) et qu'ils n'ont pas d'homologue. Les neurones DUM se retrouvent en plus grand nombre au niveau du DGA car ce dernier résulte de la fusion de cinq ganglions abdominaux primitifs (A7 à A11) lors du développement embryonnaire (Sinakevitch et al, 1995) (Figure 28B). Étant donné que ces neurones DUM sont bien caractérisés anatomiquement (Sinakevitch et al, 1995, 1996) et

physiologiquement (Grolleau et Lapied, 2000; Bräunig et Pflüger, 2001), ils sont identifiables à partir de critères morphologiques, biochimiques et électrophysiologiques.

1.4.1. Critères morphologiques

Les neurones DUM sont formés d'un corps cellulaire pyriforme, de diamètre compris entre 10 et 60 μm , d'où émerge un neurite primaire dont l'arborisation définit leur classification (Watson, 1984; Sinakevitch et al, 1996) (Figure 28C). On distingue ainsi 3 types de neurones DUM : efférents, intersegmentaires et locaux (Bräunig et Pflüger, 2001). Les neurones DUM efférents présentent un large corps cellulaire (30 à 60 μm), son neurite primaire se divise en 2 neurites secondaires qui se projettent hors du ganglion par l'intermédiaire des nerfs périphériques pour innervier des structures périphériques telles que les muscles squelettiques du système respiratoire et de la reproduction (Sinakevitch et al, 1995) (Figure 28D). Les neurones DUM intersegmentaires présentent des neurites latéraux qui ne se propagent pas vers la périphérie du ganglion, mais qui empruntent les connectifs antérieurs et/ou postérieurs du ganglion afin de relier deux ganglions entre eux. Enfin, les neurones locaux dont le soma est de plus faible diamètre (10 à 30 μm) possèdent une arborisation dendritique qui se développe au sein du ganglion.

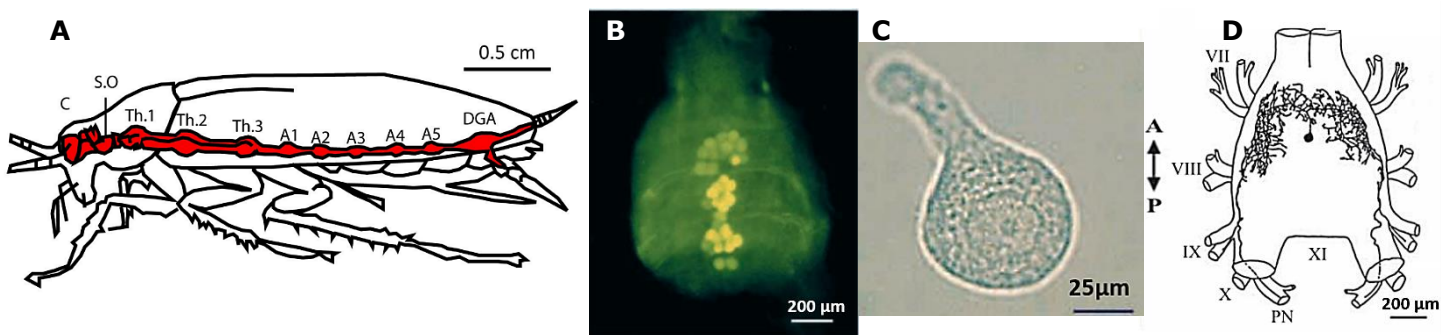


Figure 28. A) Représentation schématique de la chaîne nerveuse de la blatte *Periplaneta americana* avec les ganglions cérébroïdes (C), les ganglions sous-oesophagiens (S.O), les ganglions thoraciques (Th) les ganglions abdominaux (A) et le dernier ganglion abdominal (DGA). B) Immunomarquage de l'octopamine permettant de visualiser les groupes antérieur, médian et postérieur de neurones DUM dans le DGA. C) Photographie prise au microscope optique d'un neurone DUM isolé en culture. D) Représentation schématique d'un neurone DUM dans le DGA avec la projection des neurites vers les différents nerfs périphériques. D'après Sinakevitch et al, 1995 et Bodereau et al, 2012.

1.4.2. Critères biochimiques

Les neurones DUM efférents sont des cellules qui synthétisent et sécrètent une amine biogène, l'octopamine (Figure 28B). Cette molécule est un neuromodulateur, neurotransmetteur et une neurohormone chez la plupart des insectes et des invertébrés (Roeder, 1999; Farooqui, 2012). Elle intervient dans de nombreuses fonctions vitales chez l'insecte. Par exemple, les neurones DUM efférents abdominaux sont capables, grâce à la libération d'octopamine, de moduler l'activité des muscles squelettiques du système respiratoire ou du système reproducteur. Les

neurones DUM intersegmentaires et locaux synthétisent et sécrètent majoritairement de l'acide- γ -aminobutyrique (GABA).

1.4.3. Critères électrophysiologiques

Les DUM neurones efférents possèdent une activité électrique spontanée dite « pacemaker ». Ils génèrent donc spontanément des potentiels d'action de grande amplitude (environ 100 mV). Cette activité est générée par l'activation en boucle de canaux ioniques dépendants du potentiel. Les propriétés électrophysiologiques de ces canaux ioniques sont bien décrites (Grolleau et Laped, 2000). De plus, ces cellules neurosécrétrices possèdent l'ensemble des cibles moléculaires aux insecticides (récepteurs et canaux ioniques), ce qui en fait un modèle cellulaire de choix pour l'étude du mode d'action des insecticides (Narahashi, 1996; Narahashi et al, 2007; Casida et Durkin, 2013).

Le rôle physiologique des neurones DUM dépend de leur localisation et de leur morphologie. Les neurones DUM intersegmentaires, de par leurs projections dans la chaîne nerveuse, permettent la propagation de l'information le long de celle-ci jusqu'aux différents ganglions. À l'inverse, les neurones DUM locaux possèdent un rôle d'intégration de l'information nerveuse au sein d'un même ganglion. Quant aux neurones DUM efférents, ils possèdent deux fonctions. La première est d'innervier les muscles et organes internes de l'organisme. La deuxième est de relayer l'information sensorielle acquise par l'organisme. Par exemple, les neurones DUM efférents du DGA de la blatte *Periplaneta americana* innervent les cerques via le nerf périphérique X (Sinakevitch et al, 1996) (Figure 28C). Une stimulation des mécanorécepteurs et anémorécepteurs présents sur les cerques va produire un message nerveux qui se propagera jusqu'au DGA. Après intégration du message nerveux dans le DGA, les neurones DUM intersegmentaires enverront l'information aux neurones DUM efférents thoraciques innervant précisément les muscles des pattes. La blatte adopte alors un comportement de fuite extrêmement rapidement.

2. Évaluation *in vivo* de l'effet de l'Imidaclopride par des tests toxicologiques

De précédents travaux ont permis de montrer que la blatte *Periplaneta americana* était capable de mettre en place des mécanismes d'accommodation suite à une exposition à une dose sublétales d'Imidaclopride conduisant à une perte de sensibilité des neurones DUM vis-à-vis de cet insecticide (Benzidane et al, 2017). Afin de poursuivre cette étude et d'évaluer l'impact de cette exposition subchronique à une dose sublétales d'Imidaclopride sur la mortalité des blattes, il a été nécessaire dans un premier temps, d'établir une courbe dose-effet pour déterminer les doses létales d'Imidaclopride correspondant aux marqueurs toxicologiques d'intérêts tels que la DL₁₀, DL₅₀ et DL₉₀ représentant la dose nécessaire pour observer 10%, 50% et 90% de mortalité, respectivement.

2.1. Évaluation des marqueurs toxicologiques DL₁₀, DL₅₀ et DL₉₀

À partir de la solution mère d'Imidaclopride préparée dans du DMSO (100 µg/µL), une gamme de concentration allant de 5.10⁻⁵ µg/µL à 1 µg/µL est réalisée par des dilutions successives avec une solution sucrée à 10% (0,1 g/mL). Pour chaque concentration, 3 à 9 lots de 10 blattes sont exposés à l'insecticide où 20 µL de solution d'Imidaclopride sont ingérés par chaque blatte. La mortalité des blattes est évaluée à différents temps allant de 24h à 72h après l'intoxication aiguë aux différentes concentrations d'Imidaclopride. Pour ce faire, une légère pression de quelques secondes est réalisée sur l'abdomen. Si aucun mouvement n'est observé, la mort de l'insecte est validée. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité et la courbe dose-réponse est obtenue à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) par une régression non linéaire et ajustée selon l'équation de Hill suivante :

$$Y = m + \frac{X^{nH} (M - m)}{X^{nH} + DL_{50}^{nH}}$$

où :

- Y est le pourcentage de mortalité observée
- X est la dose d'Imidaclopride testée
- m est la valeur minimale de la courbe
- M est le maximum de la courbe
- nH est le coefficient de Hill
- DL₅₀ est la dose d'Imidaclopride conduisant à 50% de la mortalité

En parallèle, des tests toxicologiques témoins ont été réalisés à la plus forte dose de DMSO (0,1% ; v/v).

2.2. Étude de l'effet d'une exposition subchronique à une dose sublétales d'Imidaclopride sur la mortalité des blattes

2.2.1. Protocole d'intoxication

Le protocole d'intoxication repose sur 2 phases de 30 jours chacune : la première est une phase d'exposition à la dose sublétales d'Imidaclopride (0,025 µg/jour/blatte) en accord avec l'étude précédente réalisée au laboratoire (Benzidane et al, 2017) et la seconde correspond à une phase de repos sans exposition à l'Imidaclopride (Figure 29). En parallèle, des expérimentations témoins ont été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales avec une solution sucrée à 10% additionnée de DMSO (sans insecticide). Ainsi, pour chaque temps (Jour 30 et Jour 60), des blattes témoins (D30 et D60) et des blattes exposées à l'Imidaclopride (I30 et I60) sont utilisées.

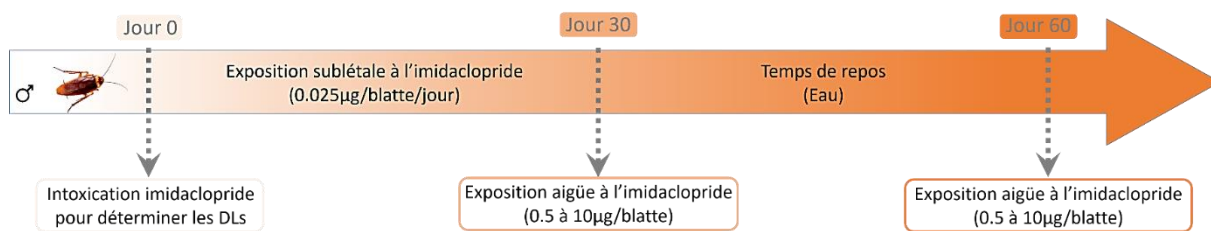


Figure 29. Protocole d'intoxication ayant permis d'obtenir nos différents groupes expérimentaux.

2.2.2. Évaluation de la mortalité

La mortalité des blattes issues des 4 conditions expérimentales (D30, I30, D60 et I60) est évaluée à 24h, 48h et 72h après une intoxication aiguë aux différentes doses d'Imidaclopride utilisées comme marqueurs toxicologiques à savoir DL_{10} , DL_{50} et DL_{90} .

3. Identification et quantification de l'expression des différentes sous-unités nicotiques

3.1. Dissection du dernier ganglion abdominal des blattes

Les blattes sont disséquées sous une loupe binoculaire afin de récupérer le dernier ganglion abdominal (DGA) qui contient des neurones DUM. Pour ce faire, les blattes sont placées pendant 30 minutes à 4°C afin de les endormir et de les anesthésier. Les blattes sont ensuite positionnées en *décubitus* dorsal afin d'avoir accès à la partie ventrale. Les sternites sont coupés selon un axe postéro-antérieur à 5 mm de part et d'autre de l'axe médian. Les ouvertures se font du dernier segment abdominal en remontant vers le premier segment abdominal. La plaque de segments découpés est alors délicatement soulevée laissant ainsi apparaître une partie de la chaîne nerveuse en position ventrale. Une fois le DGA localisé et isolé des autres organes de l'insecte à l'aide de pinces, la chaîne nerveuse ainsi que les nerfs rattachés au ganglion sont coupés. Le DGA est ensuite prélevé et déposé dans du liquide physiologique (200 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 5 mM $CaCl_2$, 4 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES ; pH 7,4).

3.2. Extraction des ARN totaux

Afin d'obtenir les ADNc nécessaires pour le clonage et la quantification de l'expression des différentes sous-unités nicotiques, une extraction des ARN totaux des DGA est effectuée à l'aide du kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel). Ainsi, 6 DGA sont broyés dans 350 µL de tampon de lyse RA1 additionné de 3,5 µL de β -mercaptoéthanol. Après la filtration du lysat sur la colonne NucleoSpin® filter (centrifugation d'1 minute à 11 000 g), les acides nucléiques sont précipités avec 350 µL d'éthanol 70% puis fixés sur une membrane de silice. Un lavage de la membrane avec 350 µL de tampon MDB permettant l'élimination des sels ainsi qu'un traitement à la DNase pendant 15 minutes à température ambiante, nécessaire à l'élimination de l'ADN génomique, sont ensuite effectués. Après l'inactivation de la DNase par l'ajout de 200 µL de tampon RAW2 et 2 lavages successifs de la membrane à l'aide du tampon RA3 (600 µL puis

250 μL), les ARN sont élués dans 60 μL d' H_2O . Afin de les concentrer et de les purifier, les ARN totaux extraits sont précipités pendant une nuit à -80°C en présence de glycogène (20 μg), de 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5,2) et de 2 volumes d'éthanol absolu. Après une centrifugation de 15 minutes à 15 000 g (4°C), le culot d'ARN est lavé à deux reprises avec 700 μL d'éthanol 70% (centrifugation de 15 minutes à 15 000 g, 4°C) puis resuspendu dans 12 μL d' H_2O ultra-pure. La quantité et la qualité des ARN sont ensuite évaluées par un dosage spectrophotométrique (SimpliNano) et les échantillons d'ARN sont conservés à -80°C .

3.3. Transcription inverse et traitement à la RNase H

Une étape de transcription inverse permettant la synthèse d'ADNc à partir des ARNm extraits est réalisée à l'aide du kit Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis® (Thermo Scientific). Ainsi, 500 ng d'ARN totaux extraits sont incubés pendant 5 minutes à 65°C avec 1 μL d'amorces oligo(dT) (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (qsp 12 μL H_2O), permettant la fixation des oligo(dT) sur la queue poly(A) des ARNm. Ensuite, 8 μL de mélange réactionnel contenant 4 μL de tampon de réaction 5X, 1 μL de RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μL), 2 μL de dNTP (10 mM) et 1 μL d'enzyme RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ μL) sont ajoutés et la synthèse d'ADNc est effectuée pendant 60 minutes à 42°C . Enfin, l'enzyme est inactivée par une étape de 5 minutes à 70°C . Afin d'éliminer les éventuels dimères ARN/ADN formés lors de la réaction de transcription inverse, un traitement à la RNase H (Thermo Scientific) de 20 minutes à 37°C est entrepris. Ainsi, 2,5 μL de tampon de réaction 10X, 0,2 μL de RNase H (5 U/ μL) et 2,3 μL d' H_2O sont ajoutés. Enfin, une incubation de 10 minutes à 65°C permettant l'inactivation de la RNase H est effectuée et les ADNc sont conservés à -20°C .

3.4. Identification des différentes sous-unités nicotiques exprimées dans le DGA de la blatte *P. americana*

Comme décrit précédemment (cf. Tableau 1, Chapitre 1, Paragraphe 4), 7 sous-unités nicotiques α (α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_6 , α_7 et α_8) et une sous-unité β nommée β_1 ont été identifiées chez la blatte *P. americana* et leurs séquences protéique et nucléotidique ont été déposées dans les bases de données NCBI. De plus, le génome de la blatte *P. americana* entièrement séquencé en 2018, mais non annoté encore à ce jour (Li et al, 2018 ; Wholes Shotgun Genome) a permis d'initier une étude bio-informatique en collaboration avec l'équipe d'Andrew Jones (Department of Biological et Medical Sciences, Université d'Oxford Brookes, GB) afin de rechercher par homologie de séquence de nouvelles sous-unités nicotiques. Ainsi, ce travail a permis de mettre en évidence 2 nouvelles sous-unités α nommées α_5 et α_9 et 9 sous-unités β (β_2 à β_{10}) dans le génome de la blatte *P. americana*. Afin de déterminer les différentes sous-unités nicotiques exprimées dans le système nerveux central de la blatte et plus précisément dans le DGA, des expériences de clonage moléculaire allant de la PCR au séquençage ont été entreprises.

3.4.1. Amplification des cadres ouverts de lecture des sous-unités nicotiniques par PCR

Les séquences nucléotidiques codant pour les différentes sous-unités nicotiniques identifiées ont été obtenues à partir d'ADNc issus de blattes non exposées, suite à une amplification par PCR utilisant une polymérase haute-fidélité, la KOD Hot start® (Novagen), selon le mélange réactionnel suivant : 2 µL de l'enzyme ADN polymérase KOD (1 U/µL), 10 µL de tampon de réaction KOD (10X), 2 µL de dNTP (10 mM), 6 µL de MgSO₄ (10 mM), 6 µL d'amorces sens et antisens (10 µM ; Tableau 9), 5 µL d'ADNc dilués au 1/20^{ème} et d'H₂O qsp 100 µL. Les conditions expérimentales de PCR sont constituées d'une étape de dénaturation initiale de 2 minutes à 95°C suivis de 25 cycles successifs composés d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, d'une étape d'hybridation de 30 secondes à la température d'hybridation des amorces spécifiques (Tableau 9) et d'une étape d'élongation d'1 minute à 70°C et enfin d'une étape d'élongation finale de 7 minutes à 70°C.

Sous-unité nAChR	N° Accession	Amorce sens 5' → 3'	Amorce antisens 5' → 3'	Température hybridation (°C)	Longueur attendue (pb)
α1	JQ585634.1	ATGGGGAGCGTGTCTCTG	TCTTCAGTCCTCCTCCGG	58	1665
α2	JQ585635.1	CATAGAATGGACGGCGAC	CTGCTAGAATTCCAAGTCGG	60	1722
α3	JQ609337.1	GCAGAAGATGAGGAACCTTT	TTCAGAGGCCAGTGGCTA	60	1685
α4	JN390946.1	AACGAGATGGTGTGTGCCG	TGCTACTGTGGTGGGCAAC	65	1700
α5	/	ACTGATGCCCCGCTTGAT	TCAGGGTCCGTATGGAGAAC	54	1519
α6	JF731243.1	ATGACATCGTCAGCCCAG	GCTACTGAACGATGATATGGG	60	1504
α7	JF731242.1	ACCATGGAGTCAACAGCAG	GATTACGTCACGATGATGTGG	57	1568
α8	JN390947.1	GCAATGGTAATGCTTCGAATG	GGACTTATTCGCTCTGGTTG	60	1630
α9	/	TGCGACACTAGAGCAGTTACAAC	TTCGGAAAAATGGGTGCAAACG	60	1942
β1	JN390948.2	ACCATGAACACGGGGGC	CTTCTCATTTCCACGATAGATCTC	60	1642
β2	/	ATGGACATCAAGCTTGTGC	CAAGATGAGTCTGTTAGTTGTATTT	48	1817
β3	/	ATGTAAGTAAAGATTGTGTT	TCACAGATAATAGCAATAATACAC	48	1236
β4	/	CACCATTTTAAAATGATTGAAAT	TACACGTGTCCTAAAATATGTAT	46	1273
β5	/	ATGCATTACGTTGGTGCAT	TTAAGTATTCCATCTTATGAATATG	48	1251
β6	/	GGTTTAGTATGCGTTATCTGAAA	GAGTTAAGTGAACATCTGATGG	46	1274
β7	/	GACCATGCTAAACTTATGGACTAC	TTACGGTATAAAACCCACCAGA	60	1273
β8	/	ATGACTTCACCCGTGCATTCT	TCCCATCAAGCAGTCCATCTAAG	60	1263
β9	/	ATGGCTTCAACTCTGCCG	TTACGGTATAAATCCCACCAGAA	60	1278
β10	/	GCTATGGGGAAAATTTCTGTTCT	CTACGGGATGAACCCAC	60	1260

Tableau 9. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des cadres ouverts de lecture des sous-unités nicotiniques identifiées chez la blatte *Periplaneta americana*. Le codon initiateur est indiqué en rouge sur l'amorce sens et le codon-stop en vert sur l'amorce antisens.

3.4.2. Purification des produits de PCR

Après une migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 0,8% en présence du marqueur de taille 1kb Plus (Invitrogen), les produits de PCR de la taille attendue sont purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel et PCR clean-up (Macherey Nagel). Ainsi, 100 mg de gel d'agarose contenant les amplicons d'intérêt sont incubés à 50°C en présence de 200 µL de tampon NTI, contenant des sels chaotropiques permettant la fixation de l'ADN sur une membrane de silice, jusqu'à la dissolution totale du gel. Les ADN en solution sont alors fixés sur une membrane de silice après une centrifugation de 30 secondes à 11 000 g. La membrane de silice contenant les ADN d'intérêt est ensuite lavée deux fois avec 700 µL de tampon NT3 (centrifugations de 30 secondes à 11 000 g) puis séchée par une centrifugation de 2 minutes à 11 000 g. Enfin, les produits de PCR purifiés sont élués avec 30 µL d'H₂O (centrifugation d'1 minute à 11 000 g) et leur quantité est déterminée par un dosage spectrophotométrique UV (SimpliNano). Une partie des amplicons correspondant aux sous-unités $\alpha 5$, $\alpha 9$ et $\beta 2$ à $\beta 10$ sont directement envoyés au séquençage (Eurofins) afin de valider les séquences nucléotidiques et protéiques prédites par l'étude bioinformatique. Concernant les sous-unités déposées dans la base de données NCBI ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ et $\beta 1$), un clonage moléculaire est entrepris.

3.4.3. Ligation des amplicons dans le vecteur de clonage pCR-Blunt

Une fois purifiés, les produits de PCR correspondant aux séquences codantes des sous unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ et $\beta 1$ sont insérés dans le plasmide de clonage pCR-Blunt du kit Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen) possédant un gène de résistance à la kanamycine et un site de clonage multiple dans le gène létal *ccdB*. La ligation entre les différents inserts et le plasmide est réalisée pendant 30 minutes à température ambiante selon le protocole suivant : 1 µL de plasmide pCR-Blunt (25 ng/µL), 2 µL d'insert purifié (rapport insert:vecteur variant entre 10:1 et 100:1 selon la concentration d'amplicon obtenue après purification), 2 µL de tampon de réaction 5X ExpressLink T4 DNA Ligase, 1 µL d'ExpressLink T4 DNA ligase (5 U/µL) et 4 µL d'H₂O.

3.4.4. Transformation bactérienne par choc thermique

À l'issue de l'étape de ligation, 4 µL de produit de ligation sont transformés dans 50 µL de bactéries chimio-compétentes *E. coli* One Shot® TOP10 sensibles à la kanamycine (Invitrogen). Pour ce faire, le mélange bactéries/produit de ligation subit un choc thermique, fragilisant la membrane des bactéries et permettant l'entrée du plasmide recombiné dans ces dernières, selon le protocole suivant : 30 minutes dans la glace suivie de 45 secondes à 42°C et de 2 minutes dans la glace. Les bactéries transformées sont alors mises en culture dans 250 µL de milieu SOC (tryptone 2 %, extrait de levure 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucose 20 mM) pendant 1 heure à 37°C sous agitation (225 rpm). Les bactéries sont ensuite étalées sur des géloses LB agar (tryptone 1 %, extrait de levure 0,5 %, NaCl 1 %, agar 1,5%) contenant l'antibiotique de sélection (kanamycine, 50 µg/mL) et incubées à 37°C sur la nuit.

3.4.5. *Criblage des colonies par PCR*

Afin de sélectionner les bactéries contenant le plasmide recombiné, 16 clones bactériens présents sur nos géloses sont mis en pré-culture dans 150 µL de milieu LB (tryptone 1 %, extrait de levure 0,5 %, NaCl 1 %) additionné de kanamycine (50 µg/mL) pendant 3 heures à 37°C sous agitation (225 rpm). L'analyse des suspensions bactériennes par PCR à l'aide des amorces M13 spécifiques du plasmide pCR-Blunt situées de part et d'autre du site de clonage multiple nous permet d'identifier les clones ayant incorporés le plasmide recombiné de ceux contenant le plasmide pCR-Blunt sans insert. Chaque amplification est réalisée avec 2 µL de suspension bactérienne, 4 µL de tampon de réaction GoTaq coloré 5X, 0,4 µL de dNTP (10 mM), 0,2 µL d'enzyme GoTaq® (5 U/µL, Promega), 1 µL d'amorces M13 sens et antisens (10 µM) et 12,4 µL d'H₂O ultra-pure selon les conditions expérimentales suivantes : une étape de dénaturation initiale de 5 minutes à 95°C, puis 35 cycles successifs composés d'une phase de dénaturation (30 secondes à 95°C), d'hybridation (30 secondes à 50°C) et d'élongation (3 minutes à 70°C), suivis d'une étape d'élongation finale de 7 minutes à 70°C. Une migration électrophorétique des produits de PCR est effectuée sur gel d'agarose à 0,8% en présence du marqueur de taille 1kb Plus (Invitrogen) afin de sélectionner les clones positifs dont 3 seront alors amplifiés dans 5 mL de milieu LB additionné de kanamycine (50 µg/mL) durant la nuit à 37°C sous agitation (225 rpm).

3.4.6. *Purification et séquençage des plasmides recombinés*

A partir des cultures bactériennes, l'extraction et la purification des plasmides contenant les séquences des sous-unités nicotiniques sont réalisées à l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel). Après avoir centrifugé les bactéries pendant 5 minutes à 11 000 g, le culot bactérien est remis en suspension dans 250 µL de tampon A1. 250 µL de tampon A2 sont ensuite ajoutés et une incubation de 10 minutes à température ambiante conduit à la lyse des bactéries, à la dégradation des protéines et à la libération du plasmide. L'ajout de 300 µL de tampon A3 inhibe la lyse bactérienne et neutralise le lysat. Une centrifugation de 5 minutes à 11 000 g permet d'éliminer les protéines, l'ADN génomique et les débris bactériens qui se retrouvent dans un précipité. Le surnageant est alors transféré dans une colonne constituée d'une membrane de silice permettant la fixation de l'ADN plasmidique. Après une centrifugation d'1 minute à 11 000 g, un lavage de la membrane est réalisé avec 600 µL de tampon A4. Deux centrifugations successives (1 minute puis 2 minutes à 11 000 g) permettent de sécher complètement la membrane. Enfin, l'ADN est élué avec 50 µL d'H₂O ultra-pure. La quantité d'ADN plasmidique extrait et purifié est mesurée par spectrophotométrie UV et la séquence nucléotidique de ces inserts est vérifiée par séquençage (Eurofins). En parallèle, une partie de la suspension bactérienne (1 mL) est conservée à -80°C en présence de glycérol (25%).

3.4.7. Analyse des séquences et établissement d'un arbre phylogénétique

Les électrophorégrammes des séquences nucléotidiques obtenus suite au séquençage ont été analysés avec le logiciel BioEdit (Hall, 1999) puis les séquences nucléotidiques ont été traduites en séquences protéiques à l'aide du logiciel Expasy (Gasteiger et al, 2003). Ces séquences nucléotidiques et protéiques ont été ensuite comparées à celles prédites ou déposées dans la base de données NCBI à l'aide d'un alignement multiple réalisé avec le programme Clustal Omega (Madeira et al, 2019).

Afin de construire un arbre phylogénétique des différentes sous-unités nicotiniques, les séquences protéiques ont été alignées à l'aide de l'outil Clustal X2 (Larkin et al, 2007) sur des séquences homologues identifiées chez différents insectes tels que le puceron *Acyrtosiphon pisum*, le tribolion rouge de la farine *Tribolium castaneum* et la blatte *Blattella germanica*. Le fichier d'alignement multiple a ensuite été visualisé à l'aide du logiciel Genedoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>) qui permet de calculer le pourcentage d'identité et de similarité entre les différentes séquences. L'arbre phylogénétique a été construit avec le logiciel MEGAX en utilisant le principe du maximum de vraisemblance et le modèle de Dayhoff. L'arbre le plus vraisemblable, après un ré-échantillonnage par « bootstrap » (n = 1000) permettant de tester la robustesse de la phylogénie, a été conservé. L'arbre phylogénétique a été enraciné avec l'ancêtre bactérien des LGIC de la famille des « Cys-Loop », la protéine GLIC (N° d'accèsion : 2XQ3_A) exprimée chez *Gloebacter violaceus*.

3.5. Analyse par PCR quantitative de l'expression des sous-unités nicotiniques en conditions physiologiques et après une exposition à une dose sublétales d'Imidaclopride.

À partir des ADNc issus des différents lots de blattes décrits précédemment (D30, I30, D60 et I60 ; cf. Partie Matériels et Méthodes, section 2.2.1), des expériences de PCR quantitative (qPCR) ont été réalisées afin de quantifier chaque sous-unité dans le DGA de la blatte et d'évaluer l'impact de l'exposition subchronique d'une dose sublétales d'Imidaclopride sur l'expression des différentes sous-unités nicotiniques déposées dans la banque de données NCBI. Chaque réaction de qPCR nécessite 10 µL de tampon de réaction Takyon No Rox SYBR® Master Mix Blue dTTP (Eurogentec), 2 µL d'amorces sens et antisens (2,5 µM pour les sous-unités $\alpha 7$ et $\beta 1$; 10 µM pour les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 8$ et pour l'actine utilisée comme gène de référence, Tableau 10), 1 µL d'H₂O et 5 µL d'ADNc dilués au 20^{ème}. La quantification est réalisée selon le programme suivant : une première étape de 3 minutes à 95°C suivie de 40 cycles de 10 secondes à 95°C et de 1 minute à la température d'hybridation des amorces (65°C pour les sous-unités $\alpha 7$ et $\beta 1$; 60°C pour les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 8$ et l'actine). En complément, l'obtention des courbes de dissociation par l'augmentation progressive de la température de 50°C à 95°C permet de vérifier la spécificité des amorces utilisées. L'efficacité des différentes amplifications de qPCR est comprise entre 98% et 102%. Toutes les réactions sont réalisées en duplicat et les valeurs seuils (Ct) sont normalisées avec un gène de référence codant pour

l'actine. L'intensité de fluorescence émise par la sonde SYBR® Green I est détectée par le thermocycleur CFX 6 Connect™ Real-Time PCR Detection System (Biorad) et les données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel CFX Maestro™ Software. L'expression relative des sous-unités nicotiniques est évaluée selon la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Sous-unité nicotinique	N° Accession	Amorce Sens (5'-3')	Amorce Antisens (5'-3')
$\alpha 1$	JQ585634.1	AGGACTCTGTGGAGGACGAG	CTCCCGGTAGAGGCAGTGGT
$\alpha 2$	JQ585635.1	TAACAACCTCCATCTCATGCC	GATCTTGCCACTCATGTTCC
$\alpha 3$	JQ609337.1	CGACACCTTCAGCATTTGTG	GCAGATGAACCCGCTAGACT
$\alpha 4$	JN390946.1	GTGTTGATGCGTACAGTGAG	AGACAGGTCATCCTTTGTAG
$\alpha 6$	JF731243.1	TGACCATCTTGCTCTCGT	CGACTCATTCCGAGAATC
$\alpha 7$	JF731242.1	CAATTGCAAGACGACACC	ATGGAGGCGATGAGAACA
$\alpha 8$	JN390947.1	ACGTGTTGTCCGCACTTCA	TATCCGGAGGAACCTGGAAG
$\beta 1$	JN390948.2	GGTGACCAAGTGCCTTAG	ATGATTGCCCTCGTAGATG
actine	AY116670.1	GACTACTGGTATTGTGCTGG	AAAGCTGTAACCACGCTCAG

Tableau 10. Tableau récapitulatif des amorces utilisées en qPCR pour quantifier les niveaux d'expression des transcrits codants pour les sous-unités décrites chez la blatte américaine *Periplaneta americana*.

4. Évaluation de l'effet de la diminution de l'expression de sous-unités nicotiniques sur la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride par la technique d'ARN interférence.

Afin de mimer les modifications d'expression des sous-unités nicotiniques observées suite à l'exposition subchronique à une dose sub létale d'Imidaclopride chez la blatte *P. americana*, la technologie d'ARN interférence a été utilisée permettant de mettre en évidence l'implication de ces sous-unités nicotiniques dans la mise en place des mécanismes d'accommodation, mais également pour contourner la perte de sensibilité des blattes acclimatées.

4.1. Principe de la technologie d'ARN interférence

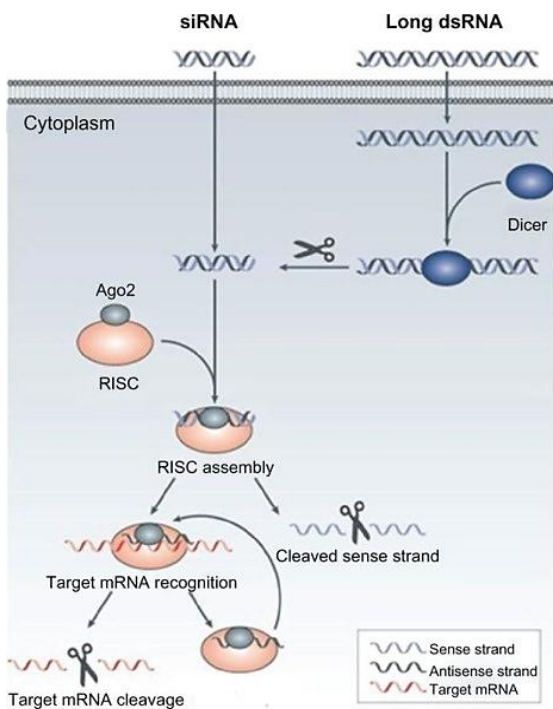


Figure 30. Représentation schématique du mécanisme de clivage des dsRNAs en siRNA, ainsi que de l'adressage au gène cible du complexe RISC par les siRNA. D'après Chen et al, 2013.

Suite à l'introduction d'ARN double brin (dsRNA, « double strand RNA ») exogène dans une cellule, ces derniers sont pris en charge par un complexe protéique composé de R2D2 et de DICER 2, une RNase de type III, afin d'être clivés en petits ARN interférents (siRNA, « small interfering RNA ») de 21 à 25 pb (Figure 30). Ces siRNA sont transférés ensuite au complexe multi-enzymatique RISC (RNA-induced silencing complex) composé d'Argonaute 2 et de protéines RP (RISC-associated protein) et doté d'une activité ribonucléasique. Le brin sens du siRNA dit « passager » sera éliminé alors que le brin antisens « guide », complémentaires à l'ARNm cible, sera conservé afin de diriger le complexe RISC vers son ARNm cible pour qu'il puisse le dégrader et empêcher sa traduction (Figure 30) (Chen et al, 2013; Ye et al, 2019).

4.2. Production des dsRNAs ciblant les sous-unités nicotiques $\alpha 2$ et $\beta 1$ de la blatte *P. americana*

4.2.1. Identification des fragments nucléotidiques spécifiques des sous-unités nicotiques d'intérêt

Un alignement multiple des séquences nucléotidiques de l'ensemble des sous-unités nicotiques de la blatte *P. americana* a été réalisé à l'aide du logiciel Clustal Omega afin d'identifier 2 fragments d'intérêt de 100 paires de bases (pb) spécifiques de la séquence codante du gène de la sous-unité nicotinique $\alpha 2$ et de celle de la sous-unité $\beta 1$.

4.2.2. Amplification des fragments spécifiques par PCR et purification des amplicons

Afin d'obtenir les fragments d'intérêt par PCR, les plasmides recombinés pCR-Blunt/ $\alpha 2$ et pCR-Blunt/ $\beta 1$ dans lesquels ont été insérées respectivement la séquence nucléotidique de la sous-unité nicotinique $\alpha 2$ et la séquence nucléotidique de la sous-unité nicotinique $\beta 1$ ont servi de matrice. L'amplification a été réalisée à l'aide de l'ADN polymérase haute-fidélité KOD Hot Start™ (Novagen) en utilisant les amorces spécifiques de chaque sous-unité ($\alpha 2$ et $\beta 1$; Tableau 11) complétées de la séquence du promoteur T7 (5'- TAATACGACTCACTATAGGG - 3') selon le mélange réactionnel suivant : 0,4 μ L d'ADN polymérase KOD (1 U/ μ L), 2 μ L de tampon KOD

(10X), 2 μ L de dNTP (2 mM), 1,2 μ L de $MgSO_4$ (10 mM), 1,2 μ L d'amorces sens et antisens (10 μ M), 2 μ L de plasmide pCR-Blunt recombiné (10 ng/ μ L) et d' H_2O qsp 20 μ L. Les amplicons sont obtenus après une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes suivie de 30 cycles composés de 3 étapes (dénaturation pendant 20 secondes à 95°C, hybridation pendant 20 secondes à 60°C et élongation de 10 secondes à 70°C) puis d'une élongation finale de 7 minutes à 70°C. En parallèle, l'amplification d'une partie de la séquence nucléotidique bactérienne codant la β -galactosidase (100 pb), présente dans le plasmide pCR-Blunt, a été réalisée en utilisant les amorces spécifiques LacZ associées à la séquence du promoteur T7 (Tableau 11). Les amplicons obtenus permettront de produire les dsRNAs dirigés contre la β -galactosidase (dsRNA-LacZ) qui serviront de témoins. Après une migration électrophorétique (gel d'agarose 2%), les produits de PCR (140 pb) sont purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel et PCR clean-up (Macherey-Nagel) selon le protocole décrit précédemment (cf. Partie Matériels et Méthodes, Section 3.4.2) et élués dans 30 μ L d' H_2O .

	Amorces (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	Position sur la séquence (N° base)
$\alpha 2$	Sens : TAATACGACTCACTATAGGGATGGACGGCGACCCTCCGTG Antisens : TAATACGACTCACTATAGGGGAACTAATAACACCATAATA	140	1-100
$\beta 1$	Sens : TAATACGACTCACTATAGGGCCGCCGACCCCTCGTACGG Antisens : TAATACGACTCACTATAGGGGGTCCGACAGCTCCATCACC	140	1123-1222
LacZ	Sens : TAATACGACTCACTATAGGGATGACCATGATTACGCCAAG Antisens : TAATACGACTCACTATAGGGTGGCGGCCGTTACTAGTGGA	140	1-100

Tableau 11. Séquences des amorces utilisées pour la synthèse des dsRNAs. La séquence du promoteur T7 est indiquée en rouge.

4.2.3. Transcription *in vitro* et synthèse des dsRNAs

Les fragments d'ADN amplifiés et purifiés sont utilisés comme matrice pour obtenir, par transcription *in vitro*, les différents dsRNAs dirigés contre i) la sous-unité $\alpha 2$ (dsRNA- $\alpha 2$), ii) la sous-unité $\beta 1$ (dsRNA- $\beta 1$) et iii) la β -galactosidase bactérienne (dsRNA-LacZ). Cette réaction permise grâce à la présence, en amont et en aval des amplicons, de la séquence du promoteur T7 est réalisée à 37°C pendant une nuit à l'aide du kit MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit (Ambion) selon le mélange réactionnel suivant (20 μ L) : 100 ng de produit de PCR, 2 μ L de chaque nucléotide (ATP, UTP, GTP et CTP ; 75 mM), 2 μ L de tampon de réaction 10X, 2 μ L d'enzyme T7 RNA polymérase. Afin d'éliminer l'ADN matrice, un traitement à la TURBO DNase (2 U) est ensuite réalisé pendant 15 minutes à 37°C. Les produits de transcription sont alors purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® miRNA (Macherey-Nagel). Ainsi, 100 μ L de tampon MP et 800 μ L de tampon MX sont ajoutés aux dsRNAs pour permettre leur précipitation et leur fixation sur une membrane de silice. Après deux lavages avec du tampon MW2, les dsRNAs sont élués dans 30 μ L d' H_2O . Enfin, après une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, les dsRNAs sont

réhybridés à température ambiante pendant 1h30. La qualité et la quantité des dsRNAs sont évaluées respectivement sur un gel d'agarose et par un dosage spectrophotométrique. Les dsRNAs sont enfin dilués à la concentration de 0,1 µg/µL et stockés à -20°C.

4.3. Préparation des lipoplexes contenant les dsRNA et ingestion de dsRNA

Les dsRNAs sont administrés aux blattes sous forme de lipoplexes (liposomes contenant les dsRNAs) par ingestion orale. En effet, une encapsulation dans des liposomes permet aux dsRNAs i) de ne pas être dégradés par les différentes enzymes présentes au niveau du tractus digestif de la blatte et ii) de faciliter leur endocytose au niveau des cellules cibles. Afin de préparer ces différents lipoplexes d'intérêt, 0,5 µg de dsRNA- α 2 ou 0,25 µg de dsRNA- β 1 à 0,1 µg/µL sont mis en contact avec 1 µL d'agent de transfection Escort IV® (Sigma-Aldrich) en présence de solutions de glucose 5% (qsp 10 µL) pendant 30 minutes à température ambiante. En parallèle, les lipoplexes témoins sont produits dans les mêmes conditions avec les dsRNAs-LacZ. Les lipoplexes sont ingérés par la blatte selon la méthode de Huang et collaborateurs (Huang et al, 2018). Brièvement, 10 µL de solution de lipoplexes contenant les dsRNAs (dsRNA- α 2, dsRNA- β 1 ou dsRNA-LacZ) sont déposés progressivement, à l'aide d'une pipette P10, au niveau des pièces buccales de la blatte qui est maintenue par les ailes afin qu'elle les ingère. Ainsi, les dsRNAs- α 2 et leur témoin respectif sont ingérés par des blattes n'ayant jamais été en contact avec des insecticides contrairement aux dsRNAs- β 1 et les dsRNAs-LacZ associés qui sont ingérés par des blattes ayant été exposées pendant 30 jours à la dose sub létale d'Imidaclopride.

4.4. Validation des dsRNAs par PCR quantitative

96h après l'ingestion orale des dsRNAs, les blattes sont disséquées sous une loupe binoculaire afin de récupérer le dernier ganglion abdominal (DGA) (cf. Partie Matériels et Méthodes, Section 3.1). Pour quantifier l'expression des différents transcrits issus des DGA provenant des blattes ayant ingéré les dsRNAs, les ARN totaux extraits sont rétrotranscrits en ADNc selon les protocoles décrits précédemment (cf. Partie Matériels et Méthodes, Section 3.2). Enfin, des expériences de qPCR sont réalisées afin d'évaluer la diminution des sous-unités nicotiques cibles et l'impact des dsRNAs sur l'expression des sous-unités nicotiques déposées dans la base de données NCBI selon la procédure présentée précédemment (cf. Partie Matériels et Méthodes Section 3.5).

4.5. Évaluation de la modulation de la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride par des tests toxicologiques

Afin d'évaluer l'implication de la sous-unité nicotinique $\alpha 2$ dans la mise en place de mécanismes d'acclimatation à l'Imidaclopride et de mettre en évidence l'importance de la sous-unité $\beta 1$ dans la lutte contre les insectes « résistants », des expériences d'intoxication aiguë à l'Imidaclopride (DL_{90} et/ou DL_{50}) sont réalisées sur des blattes ayant ingéré les différents dsRNAs 96h après leur ingestion. La mortalité des blattes est observée à différents temps allant de 24h à 96h post-intoxication (cf. Partie Matériels et Méthodes, Section 4.3).

5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats de qPCR et des tests toxicologiques sont réalisées selon un test de Mann-Withney, à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 7.00, GraphPad Software) où les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,001$).

6. Impact d'une exposition subchronique à une dose sublétales d'Imidaclopride sur l'ensemble des transcrits du DGA de la blatte : analyse par séquençage du transcriptome à haut débit (RNAseq)

6.1. Échantillonnage et obtention des ARN totaux nécessaires à l'analyse de séquençage haut débit (RNAseq)

L'échantillonnage des blattes a été organisé afin de répondre à une quantité d'ARN minimale demandée par la plateforme de séquençage soit 2 μg . En tout, plus de 300 blattes ont été prélevées, réparties dans nos 4 conditions expérimentales (D30, I30, D60 et I60). Ces blattes ont suivi le protocole d'intoxication (Figure 29) de manière désynchronisée afin d'obtenir les conditions D60/I60 arrivant à terme en même temps que les conditions D30/I30. Ces 4 conditions sont subdivisées en 3 réplicats biologiques contenant chacun au moins 25 blattes. Le prélèvement des DGA a été réalisé comme décrit précédemment (cf. Partie Matériels et Méthodes, Section 3.1). Pour chacune des conditions expérimentales (D30, I30, D60 et I60), les DGA de chaque réplicat biologique sont broyés à l'ultraturax dans 1,4 mL de tampon de lyse RA1 contenant 1% de β -mercaptoéthanol du kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) puis les ARN totaux sont extraits et purifiés selon les protocoles décrits en section 3.2. Après un contrôle de la quantité et de la qualité par spectrophotométrie et à l'aide du bioanalyseur Agilent respectivement, les échantillons d'ARN totaux (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ et 2 μg au minima) ont été transmis à la plateforme MGX-Montpellier GenomiX.

6.2. Séquençage

Le séquençage, le traitement des données, la construction du transcriptome *de novo* et la mesure des gènes différentiellement exprimés ont été réalisés, dans un premier temps, par la plateforme MGX de Montpellier. Des analyses complémentaires à partir des données brutes ont été effectuées et seront abordées dans la partie « Méthode d'analyse » (cf. Partie Matériels et Méthodes, Section 6.3). La construction des banques d'ARNm a été réalisée en 7 étapes selon le kit « TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation d'Illumina ». Les ARN totaux ont été triés grâce à des billes magnétiques recouvertes d'oligo dT. Ainsi, seuls les ARNm matures présentant une queue polyadénylée, et donc exprimés au moment de l'échantillonnage, ont été retenus pour le séquençage. Ces ARNm ont été fractionnés chimiquement à l'aide de cation divalent en solution et chauffés à haute température (protocoles Illumina® protégés)(Illumina, 2017). Puis, une étape de rétrotranscription suivie d'une transcription modifiée, au cours de laquelle le dTTP est remplacé par dUTP, permet d'obtenir des ADNc doubles brin. Les fragments d'ADN ainsi obtenus sont adénylés à leurs extrémités 3' et 5' afin d'y lier des adaptateurs. L'adaptateur en 3' contient une séquence appelée index qui sera propre à chaque condition et réplicat. Les séquences index utilisées sont reportées dans le tableau 12.

Echantillon	Index
D30_1	ACAGTG
D30_2	GCCAAT
D30_3	CTTGTA
D60_1	AGTTCC
D60_2	ATGTCA
D60_3	GTGAAA
I30_1	CGATGT
I30_2	TGACCA
I30_3	CAGATC
I60_1	TAGCTT
I60_2	GGCTAC
I60_3	GTTTCG

Tableau 12. Séquences index correspondant à chaque condition et réplicat

En 5', est ajouté l'adaptateur universel. Les séquences des adaptateurs universels et celles des adaptateurs contenant l'index, nommé adaptateur indexé, utilisés pour le séquençage sont les suivantes

Adaptateur universel :

5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

Adaptateur indexé :

5' GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC **[index]** ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG

Enfin, une étape d'amplification par PCR, qui permettra une sélection et une amplification des fragments portant les deux types d'adaptateurs, est effectuée. La validation de ces banques est

réalisée grâce à une quantification (concentration et taille des fragments) de l'ADN sur Fragment Analyzer (kit Standard Sensitivity NGS) ainsi que par qPCR (ROCHE Light Cycler 480). Le séquençage a été réalisé sur la banque d'ADNc ainsi générée avec un séquenceur Illumina HiSeq 2500 grâce à la technique de SBS (Sequence By Synthesis, kit HiSeq Rapid SBS) en *paired-end* de 125 nucléotides. Le séquençage *paired-end* permet de séquencer les deux extrémités d'un fragment, c'est-à-dire à la fois les brins matrices sens et antisens de chaque groupe de fragments amplifiés sur la cellule de séquençage (Figure 31). Une fois que le nombre de cycles nécessaire est atteint, ici 125 cycles, car le séquençage est réalisé pour les 125 premières paires de bases de chaque extrémité de fragments, le brin néo-synthétisé est déshybridé. Une nouvelle amorce sera alors hybridée permettant la lecture de l'index associé à chaque séquence. Avant le séquençage de la 2^{ème} extrémité, une étape intermédiaire permet le retournement du brin d'ADNc fixé sur la cellule de séquençage, exposant ainsi l'adaptateur universel nécessaire au séquençage des 125 autres nucléotides. Le séquençage de la 2^{ème} extrémité subit alors le même processus décrit précédemment. Les séquences de 125 nucléotides séquencées dans un sens puis dans l'autre sont appelées « Read 1 » et « Read 2 ».

6.3. Méthode d'analyse ad hoc

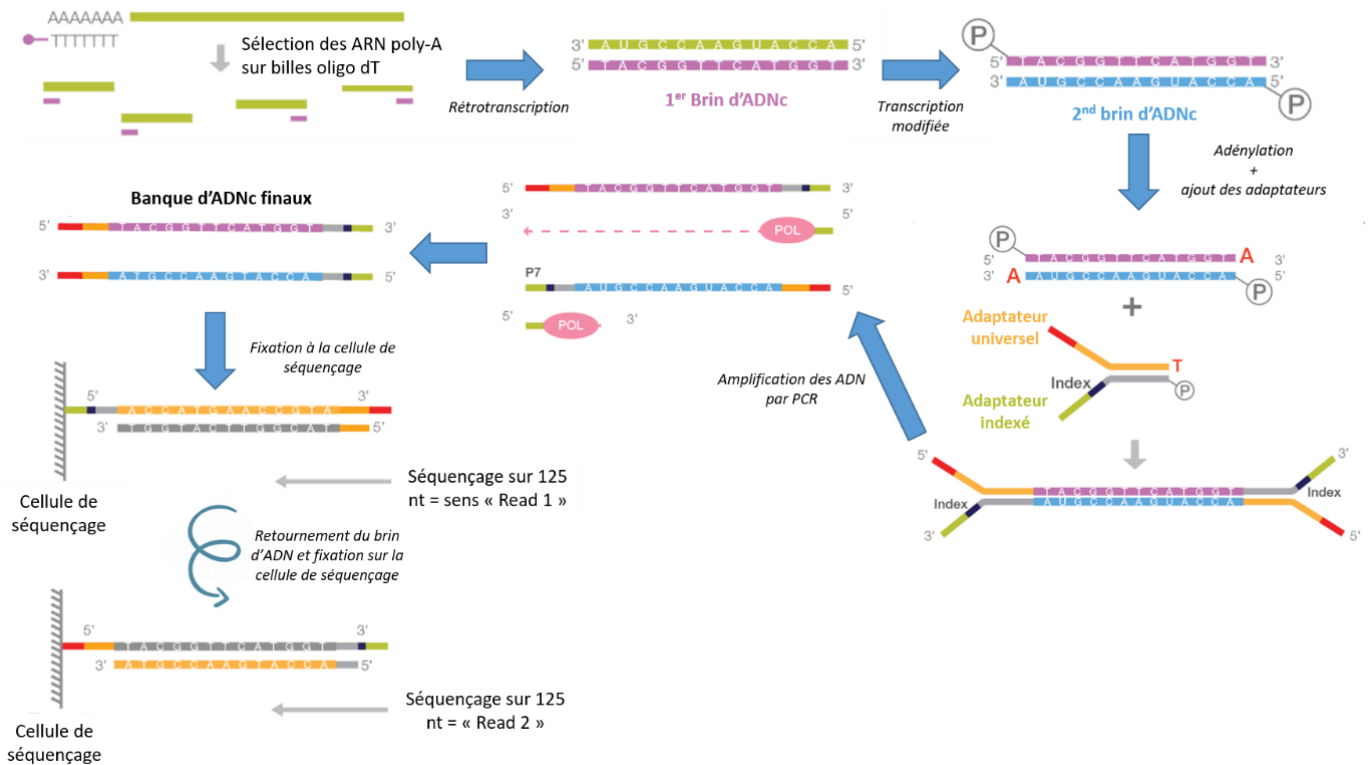


Figure 31. Représentation schématique simplifiée du séquençage ARN. Modifiée d'après le protocole Illumina TruSeq Stranded mRNA®.

Dans le but d'étudier les gènes différentiellement exprimés en fonction des conditions expérimentales, le traitement des données issues du séquençage ARN a été réalisé selon 2 approches différentes. Comme précisé précédemment, les données ont été entièrement analysées par la plateforme de séquençage MGX. Les résultats obtenus étaient d'excellente qualité et permettaient de détecter de nombreux gènes différentiellement exprimés. Néanmoins, l'identification de ces gènes différentiellement exprimés était difficilement réalisable de par la nature *de novo* de ce séquençage ARN et de par l'existence d'un génome de blatte *Periplaneta americana* séquencé, mais non annoté (Li et al, 2018). De plus, le protocole de traitement de données de MGX, fournissant des résultats robustes et sans équivoque, ne nous permettait pas d'observer les ARNs très faiblement exprimés, comme c'est le cas pour certaines sous-unités nicotiques. En repartant des données brutes du séquençage, et en modifiant les paramètres de construction du transcriptome *de novo*, il a été possible de mettre en évidence nos séquences d'intérêt comme par exemple les séquences des sous-unités nicotiques. Cette analyse a été réalisée en collaboration avec le laboratoire iEES appartenant à Sorbonne Université située sur le Campus Pierre et Marie Curie. Les outils utilisés dans cette analyse sont ceux disponibles sur le portail Galaxy de la plateforme du BIPAA (« BioInformatics Platform for Agroecosystem Arthropods »). Les versions des protocoles utilisés dans le portail Galaxy seront précisées. Nous avons utilisé deux approches différentes afin d'obtenir des informations sur les variations d'expressions de transcrits en réponse à une dose sub létale, mais aussi l'identification précise de gènes impliqués dans le système cholinergique de la blatte *Periplaneta americana*.

6.4. Construction du transcriptome

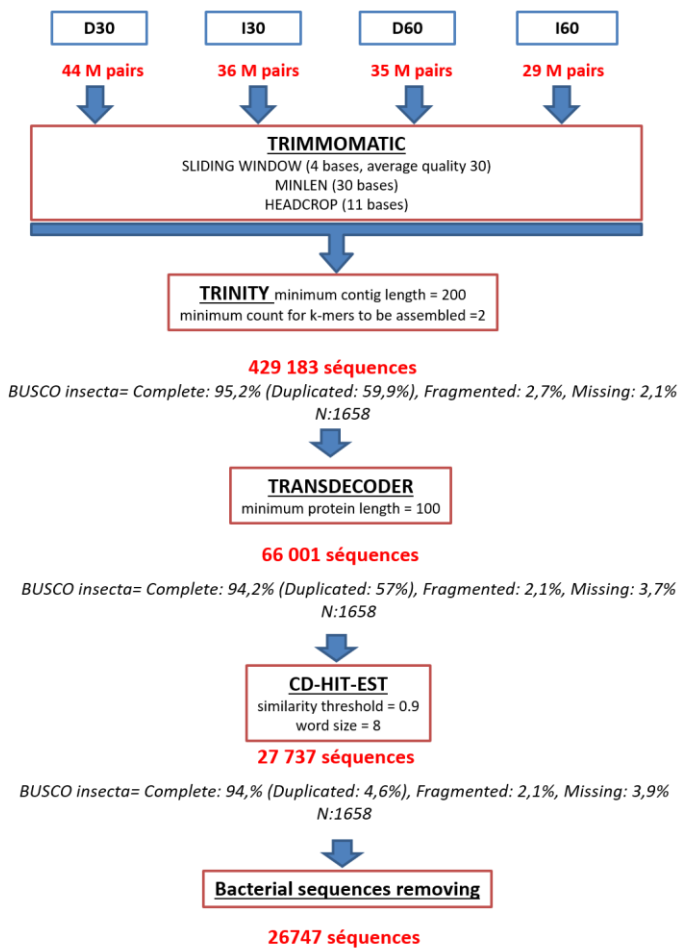


Figure 32. Représentation schématique des outils bioinformatiques utilisés dans la réalisation du transcriptome *de novo* de la blatte *Periplaneta americana*

Cette première partie consiste, dans un premier temps, à la construction d'un transcriptome *de novo* alternatif à celui fourni par la plateforme de séquençage. Le transcriptome alternatif a ensuite été utilisé comme base de travail dans les 2 approches. Les données brutes issues du séquençage ARN en 125 paired-end ont été réanalysées (Figure 32).

La totalité des reads de nos 4 conditions expérimentales a été rassemblée afin d'être traitée selon un protocole d'analyse de séquence : Trimmomatic (version 0.36.6) associé à fastqc 0.72. Ce dernier sert à nettoyer les données de séquençage en supprimant les séquences des adaptateurs, mais aussi en analysant la qualité des reads obtenus. L'amélioration de données de séquençage passe par l'élimination des reads qui peuvent être trop courts ou comportant une base non caractérisée. Puis, 11 nucléotides sont supprimés du début du read, car le séquençage est souvent de moindre qualité au début. Ceci a été réalisé avec les

options « Sliding Window », « Minlen » et « Headcrop » dont les paramètres sont rapportés en Figure 32. Les reads sont alors prêts à être utilisés pour former des contigs. Les contigs sont une construction artificielle, réalisée ici avec Trinity (version 2.8.4), d'une séquence nucléotidique à partir du chevauchement contigu des séquences de reads ayant des similarités. La similarité de séquences est donc un paramètre important dans la construction d'un transcriptome. L'assemblage des reads se fait par la fragmentation des reads en sous-séquences, appelées k-mers, qui sont ensuite mis bout à bout selon le principe des graphes de Bruijn (Grabherr et al, 2011). Cette méthode s'avère particulièrement appropriée dans le cas d'une construction d'un transcriptome *de novo* sans support génomique de référence. À l'issue de l'assemblage par Trinity, nous obtenons 429 183 séquences longues d'au moins 200 paires de bases. Il est important de noter que des séquences chimériques peuvent être produites lors de ce traitement informatique. Or, le transcriptome est censé représenter les transcrits exprimés dans tous nos échantillons au moment de l'échantillonnage. Grâce au logiciel Transdecoder

(version 3.0.1), nous réalisons donc un tri de tous ces contigs en ne gardant que ceux dont la séquence nucléotidique code pour une ou plusieurs protéines d'au moins 100 AA. Les 66 000 séquences restantes sont alors analysées par l'algorithme CD-HIT-EST afin de regrouper des séquences de transcrits similaires, en réduisant la redondance des séquences. Cette étape aboutit à l'amélioration des performances et à la précision des analyses de séquences spécifiques en aval. Il est important de préciser qu'après chaque étape, un score BUSCO (BUSCO version 3.0.2+ galaxy1) est calculé sur les données obtenues. Ce score permet d'obtenir des informations sur la qualité, mais aussi la représentativité des données générées. Par exemple, on peut constater dans la figure 32 que le nombre de séquences dupliquées dans le score BUSCO passe de 59,9% après la construction du transcriptome par Trinity à 4,6% après l'utilisation de l'algorithme CD HIT-EST (version 1.3). Le score BUSCO est un proxy permettant d'évaluer la qualité et la complétude globale d'un transcriptome. Il se calcule grâce à la comparaison d'une base de données regroupant les orthologues uniques attendus dans un clade précis, ici les insectes avec la base de données « insecta » (version odb9), avec le transcriptome assemblé *de novo* (Simão et al, 2015). En prenant l'exemple du dernier score BUSCO après le CD-HIT-EST, on peut constater que l'on retrouve 94% des orthologues uniques attendus, peu de dupliqués, seulement 2,1% retrouvés de manière fragmentée et 3,9% manquants. Au-dessus de 90% d'orthologues retrouvés dans un transcriptome, on peut considérer que celui-ci sera bien représentatif des transcrits exprimés dans notre modèle. Enfin, le transcriptome est nettoyé une dernière fois des transcrits provenant de possibles contaminations bactériennes ou d'organismes non désirés pendant l'échantillonnage. Pour cela, on réalise un « blast nr » sur tout le transcriptome *de novo* et on élimine les séquences possédant une très forte identité avec des organismes bactériens qui pourraient être une source de contamination involontaire lors de l'échantillonnage. Nous obtenons ainsi un transcriptome prêt à être utilisé dans nos 2 approches. L'approche sans *a priori* est celle classiquement utilisée et repose sur la détection de gènes différentiellement exprimés ainsi que sur leur identification.

6.5. Approche sans *a priori*

La première approche repose sur l'analyse des gènes différentiellement exprimés entre nos conditions. Pour cela, les reads obtenus lors du séquençage sont alignés sur les contigs issus du transcriptome. L'alignement des reads a été effectué à l'aide de bowtie2 (version 2.3.4.3) et permet le comptage de ces reads alignés et ainsi de déterminer un niveau d'expression relatif de celui-ci par rapport à la totalité des reads séquencés. En effet, plus un transcrit est exprimé plus le nombre de reads capables de s'aligner sur le contig représentatif de ce transcrit sera important. À l'inverse, un transcrit faiblement exprimé aura peu de reads séquencés par rapport à la totalité du séquençage. Le nombre de reads alignés pour ce transcrit sera donc plus faible. Le comptage des reads alignés a donc été réalisé à l'aide du compteur kallisto (version 0.46.0). Afin de ne pas induire un biais dans ce comptage, le nombre de reads alignés est normalisé par rapport à la longueur des transcrits sur lesquels ils sont alignés. En effet, plus un transcrit sera

long, plus celui-ci aura un nombre élevé de reads capables de s'aligner dessus. Ceci consiste donc à rapporter le nombre de reads alignés pour une longueur donnée de transcrit et donc à estimer l'abondance d'un transcrit dans notre échantillon exprimé en FPKM (Fragment per Kilobase Million). Afin de comparer nos conditions entre elles, il est également nécessaire de normaliser les expressions de transcrits entre eux. En effet, les variations de qualité et de quantité des ARNs entre échantillons peuvent induire des différences dans le nombre de reads totaux qui ont été séquencés, conservés, alignés et qui peuvent participer à l'analyse des gènes différentiellement exprimés. Ces différentes normalisations ont été réalisées à l'aide de l'outil TMM *via* la suite « Build expression matrix » (version 2.4.0.2) en construisant une matrice d'expression de transcrits afin de les comparer entre eux par réplicats et en fonction des conditions expérimentales. Enfin, l'analyse statistique des gènes différentiellement exprimés dans cette matrice d'expression a été réalisée avec les protocoles edgeR et Deseq2.

6.6. Approche orientée

La seconde approche consiste à identifier les séquences des gènes d'intérêts à partir du transcriptome *de novo*. Il est important de préciser que les séquences obtenues correspondent aux transcrits provenant des blattes issues de l'élevage. Il est donc possible que des différences de séquences apparaissent sporadiquement si l'on compare avec d'autres séquençages transcriptomiques (Total Shotgun Assembly : GBJC, GEIF, GAWS et GFCQ) ou génomique (Whole genome shotgun : PGRX00000000.1, BioProject PRJNA414776) (Li et al, 2018). Dans un premier temps, il a été nécessaire de dresser une liste de gènes d'intérêt. Ceci a été réalisé en sélectionnant des gènes connus comme interagissant avec les sous-unités nicotiniques ou participant à la transmission synaptique (Jones et al, 2010) ou bien différentiellement exprimés lors d'une exposition sublétales d'Imidaclopride chez d'autres organismes (Shi et al, 2017; Wu et al, 2017). Au total, une soixantaine de gènes ont été retenus afin d'être retrouvés chez la blatte américaine. Puis, afin d'obtenir le plus d'éléments de comparaison possible, ces gènes ont été répertoriés chez *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegyptii*, *Nilaparvata lugens* et *Blattella germanica*. Les séquences nucléiques et protéiques chez ces différentes espèces ont été identifiées par homologie de séquence et validée, lorsque cela était possible, par une bibliographie décrivant le gène considéré. La base de données ainsi acquise a servi de fondation dans la recherche des séquences putatives de ces gènes chez la blatte *Periplaneta americana*. Pour se faire, les séquences protéiques de chaque gène appartenant à l'espèce la plus proche qui est la blatte *Blattella germanica*, ont été recherchées par *tblastn* sur les 4 transcriptomes disponibles pour la blatte *Periplaneta americana* (Total Shotgun Assembly : GBJC, GEIF, GAWS et GFCQ). Ceci permet d'obtenir une séquence nucléotidique prédite à partir d'une requête protéique. En cas de doute, ou de non-alignement, la même méthode a été réalisée en utilisant la séquence protéique de ce même gène dans une espèce différente. En parallèle de cette recherche bio-informatique, le clonage des sous-unités nicotiniques a été entrepris afin de comparer les séquences théoriques prédites, celles séquencées pendant le

séquençage ARN, et les séquences des clones obtenus. Une fois toutes les séquences prédites de gènes d'intérêt récupérées, une recherche de séquences protéiques identiques ou proches a été effectuée dans tous les contigs du transcriptome *de novo*. Le but de cette opération était d'identifier certains contigs comme étant une séquence d'intérêt et non un simple assemblage de reads non identifiés. Ainsi, lors de la recherche de gènes différentiellement exprimés de l'approche sans *a priori*, les reads s'alignant sur le contig caractérisé pouvaient être considérés comme appartenant au gène d'intérêt. Afin de confirmer et valider la cohérence de cette méthode, un alignement des contigs avec les séquences prédites a été effectué grâce à l'algorithme MAFFT implémenté dans le logiciel Geneious (version 2020.1.2) en utilisant comme espèces voisines *Nilaparvata lugens* et *Blattella germanica*. Enfin, un alignement des séquences protéiques prédites a été réalisé sur le génome de la blatte américaine, long de 3,38 milliards de bases, à l'aide du logiciel Scipio sur le portail Galaxy.

Partie 3 : Résultats

L'ensemble de ces travaux a conduit à la réalisation d'un article publié dans « Current Opinion in Insect Science », d'un article en révision avec des modifications mineures dans « Pest Management Science », d'un article soumis pour publication dans « Journal of Pest Science » et de deux manuscrits en cours de préparation. Ainsi, ces résultats seront déclinés sous 5 études :

- L'étude 1 présente l'état de l'art des connaissances scientifiques sur l'effet des doses sublétales d'insecticides sur les insectes.
- L'étude 2 porte sur l'identification des différents récepteurs ionotropes de la famille des « Cys-loop » chez la blatte *P. americana*.
- L'étude 3 rapporte les effets d'une exposition à une dose sublétale du néonicotinoïde Imidaclopride sur la sensibilité des blattes et le rôle de la sous-unité $\alpha 2$ dans les phénomènes d'accommodation.
- L'étude 4 permet de montrer que la technologie d'ARN interférence ciblant un acteur clé du système cholinergique de la blatte *P. americana* tel que la sous-unité nicotinique $\beta 1$ pourrait être utilisée pour lutter contre les insectes nuisibles tout en contournant les phénomènes d'acclimatation.
- L'étude 5 présente les modifications transcriptionnelles induites par l'exposition à une dose sublétale d'Imidaclopride des blattes mises en évidence par une analyse RNAseq.

Étude 1 : Modifications cellulaires et physiologiques induites par une exposition à des doses sublétales d'insecticide chez les insectes

Les insecticides sont pour la majorité d'entre eux des neurotoxiques (plus de 80%) qui agissent principalement sur des canaux ioniques, des enzymes et des récepteurs membranaires situés dans le système nerveux central des insectes. Ces insecticides bloquent les fonctions physiologiques des insectes par leur action directe sur leurs cibles moléculaires ou de façon indirecte en modifiant l'activité des enzymes de détoxification. Leur utilisation considérée comme la principale stratégie de lutte contre les ravageurs de culture et contre les insectes vecteurs de maladie a permis d'accomplir de nombreux progrès en matière de rendements agricoles et de protection des cultures, mais également en santé publique. Toutefois, le problème majeur lié à leur utilisation non-raisonnée est l'apparition d'insectes résistants aux insecticides conduisant à une perte d'efficacité de ces derniers. À ce jour, de nombreuses données scientifiques sont disponibles sur les différents mécanismes de résistance induits suite à une exposition à de fortes doses d'insecticides tels que le comportement d'évitement, l'épaississement de la cuticule, l'augmentation de l'activité des enzymes de détoxification ou la mutation des cibles des insecticides. De plus, suite à une application d'insecticides, ces derniers peuvent se dégrader avec le temps et/ou se volatiliser avec le vent. Par conséquent, la concentration de produits phytosanitaires initialement utilisée pour tuer les insectes nuisibles diminue jusqu'à devenir sublétale. Ainsi, ces dernières années, les scientifiques attirent l'attention sur les effets des doses sublétales d'insecticides chez les insectes nuisibles, mais également chez les insectes auxiliaires qui pourraient contribuer au développement de mécanismes de résistance. Cette revue scientifique présente une synthèse des connaissances essentielles permettant de comprendre comment une exposition à une dose sublétale d'insecticide peut conduire à des modifications physiologiques et cellulaires chez les insectes. L'ensemble des études comportementales ainsi que les études transcriptomiques et génomiques ont permis d'accroître nos connaissances sur les mécanismes d'adaptation mis en place par l'insecte suite à une exposition à une dose sublétale d'insecticide. Enfin, la compréhension de ces mécanismes pourra permettre le développement de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes nuisibles ou encore l'optimisation de celles déjà mises en place.

Cette étude a fait l'objet d'une publication en 1^{er} auteur :

“Exposure to sublethal doses of insecticide and their effects on insects at cellular and physiological levels”, *Current Opinion in Insect Science*, 2018, Vol. 30, p 73-78.

Alexandre Bantz¹, Jérémy Camon¹, Josy-Anne Froger¹, Delphine Goven¹, Valérie Raymond¹

1 : Laboratoire SiFCIR, UPRES-EA2647 USC INRA 1330, SFR 4207 QUASAV, Faculté des Sciences, Université d'Angers, France

Exposure to sublethal doses of insecticide and their effects on insects at cellular and physiological levels

Alexandre Bantz, Jérémy Camon, Josy-Anne Froger, Delphine Goven and Valérie Raymond



Insecticides were used as pest management tools for a long time. The appearance of resistant insects has led the scientific community to rethink their use and to study the mechanisms underlying the resistance in order to circumvent it. However, we know now that sublethal doses of insecticide induce many effects which should be taken into account for pest control. In this review, we summarized current knowledge on mechanisms used by insects to deal with exposure to sublethal dose of insecticides. Physiological and cellular changes could contribute to the adaptation of the insect to its environment making the challenge of managing pests difficult.

Address

Laboratoire « Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et Récepteurs » (SiFCIR), UPRES-EA2647 USC INRA 1330, SFR 4207 QUASAV, UFR Sciences, Université d'Angers, 2 Bld Lavoisier, 49045 Angers Cedex 01, France

Corresponding author:

Raymond, Valérie (valerie.raymond@univ-angers.fr)

Current Opinion in Insect Science 2018, **30**:73–78

This review comes from a themed issue on **Neuroscience**

Edited by **David Sattelle** and **Kazuhiko Matsuda**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 27th September 2018

<https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.09.008>

2214-5745/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

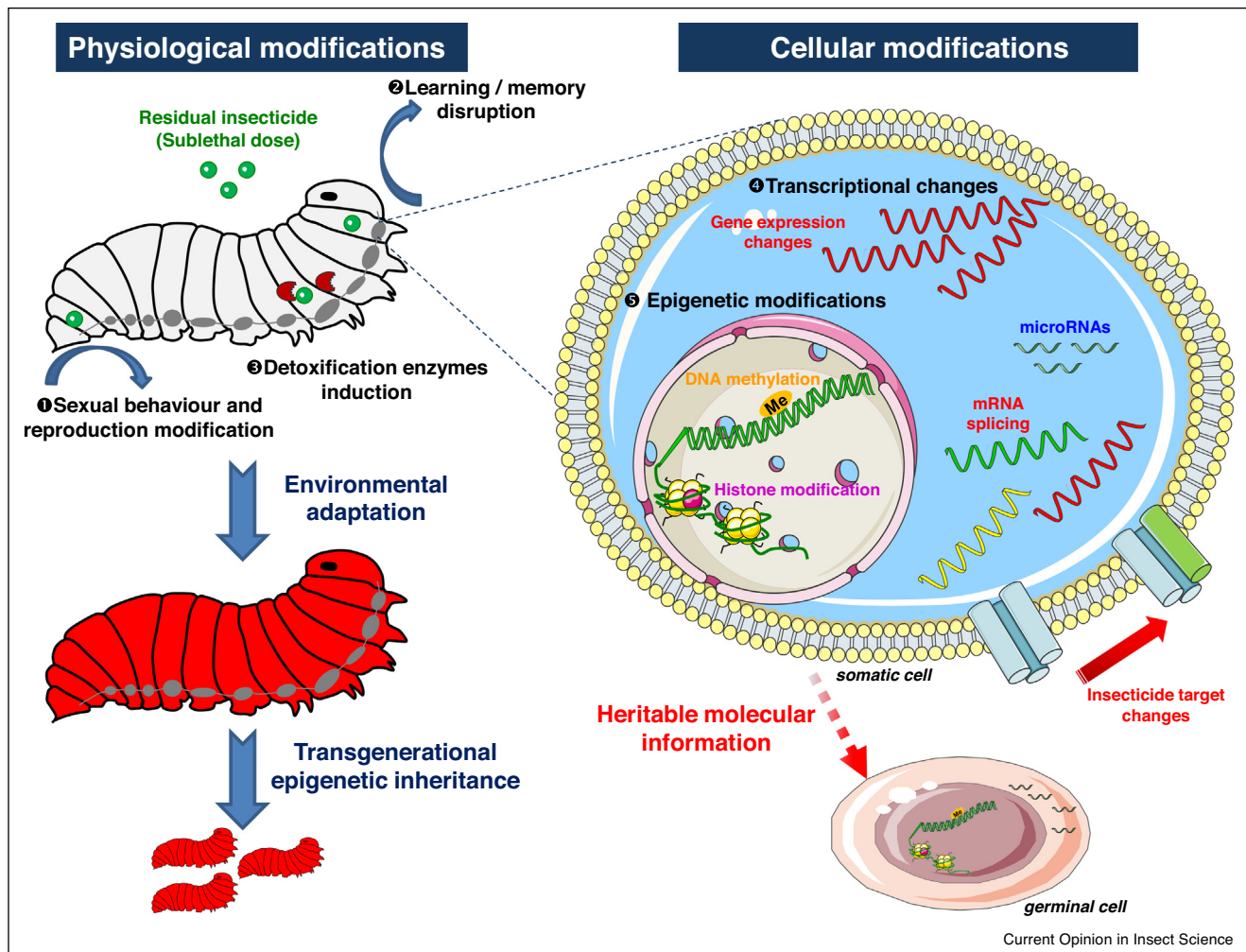
Insecticides are pesticides which mainly act on neuronal ion channels and receptors [1,2]. Their use was considered as the main pest management strategy over a long period. Indeed, the insecticides block physiological functions through their actions directly on molecular targets or indirectly on detoxification enzymes. However, one major problem linked to their widespread use is the emergence of resistance to insecticides. The mechanisms of resistance such as behavioural avoidance, thickening of the cuticle, increased activity of detoxification enzymes or mutation of the insecticide targets have been well studied [1,3,4]. Pests and disease vectors which undergo strong insecticide selection pressure, develop resistance to the used compounds and often proceed cross-resistance to

compounds with similar chemical structure or with the same mode of action. The levels of resistance or cross-resistance depend on the mechanisms involved. To circumvent this problem, agrochemical industries try to develop new chemicals to replace the ineffective insecticides. However, we know now that not only the use of lethal insecticide concentration but also sublethal exposure can induce physiological changes favouring the development of resistant or adapted insects. Following a field application of insecticides, insects may be exposed to different doses. Also, insecticides degrade over time or can volatilize with wind. Consequently, the concentration of products initially used to kill pests and disease vectors decreases until it becomes sublethal [5,6]. The degradation of this initial product can also generate metabolites exhibiting biological activity. The effect of low residual doses of these compounds that can affect both targeted species but also beneficial insects became a major concern [7]. Indeed, exposure to low dose of insecticide can induce different effects on insects. This brief review provides an insight into the knowledge essential to understand how exposure to sublethal dose of insecticide modifies the insects at physiological and cellular levels. The behavioural studies as well as the transcriptomic and genomic studies have helped to increase our knowledge on the changes induced by sublethal exposure to insecticides (Figure 1).

Exposure to sublethal dose of insecticides: a good opportunity for the pests and disease vectors to stay alive

Insecticides are initially used to control pest insects. However, studies demonstrated that exposure to low dose of insecticides can benefit several insects. Thus, the effect of insecticides is biphasic. This phenomenon is known as hormesis. According to Cutler and Guedes [8], hormesis is defined as ‘a biphasic dose-response, characterized by high-dose inhibition and low-dose stimulation during or following exposure to a toxicant’. Study of insecticide-induced hormesis demonstrated that low doses of insecticide stimulate biological processes in order to increase insect survival and reproduction [9–12]. Indeed, sublethal dose of sulfoxaflor, a sulfoximine insecticide which is an agonist of nicotinic acetylcholine receptors, shortened the developmental time of the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* and increased their fecundity [10]. In the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*, males exposed to sublethal dose of deltamethrin,

Figure 1



General scheme summarizing adaptation mechanisms of insect through different physiological and cellular modifications in response to sublethal dose of insecticides.

Exposure to low dose of insecticides affects life history traits such as physiological functions (①, ②, ③) that are due to cellular alterations by gene expression modifications (④, ⑤). These mechanisms can be passed to offspring.

an insecticide acting on voltage-gated sodium channels, shown a higher rate of reproductive success compared to untreated males. This positive effect on male sexual behaviour is linked specifically to a change of pheromonal detection [11]. All these data shown that insects adapt their physiology to be able to cope with sublethal exposure to insecticides in order to keep their population growth.

However, these sublethal exposures can also cause adverse effects. Sublethal concentrations of cyantraniliprole, a novel insecticide targeting ryanodine receptors, decreased growth speed and population reproduction of *Agrotis ipsilon* [13]. It was also shown that a sublethal dose of imidacloprid, which belong to the neonicotinoid class of insecticides, is cytotoxic for the honeybee brain and

causes damage to the honeybee midgut [14]. This sublethal exposure also has an impact on foraging ability of bumblebees [15]. To understand the observed effect at cellular levels, further studies have been done on the mushroom body cells called Kenyon cells which are involved in learning and memory in insects. Thus, exposure to sublethal doses of insecticides reduced microglomerular density of mushroom bodies [16] and induced Kenyon cell alterations [14,17]. In these conditions, imidacloprid caused abnormal neural connectivity and damaged the development of mushroom bodies [16]. These effects could explain learning and memory disruption elicited by neonicotinoids [18–20].

In addition to stimulating different life history traits [9–12,21], exposure to a sublethal dose of insecticides could

induce production of enzymes that detoxify insecticides and this effect could participate in the development of insecticide tolerance or resistance in pest insects. There are several detoxification mechanisms in insects such as Cytochrome P450 monooxygenases, glutathione S-transferases (GST) and esterases. Biochemical and proteomic analysis demonstrated that the exposure to sublethal dose of insecticides modifies protein level and activity [22] and by consequent physiology and behaviour of insects. It was shown that the positive effect on male *S. littoralis* sexual behaviour is linked to three detoxification proteins such as GST or antennal esterase which were overexpressed in these conditions [11]. The fecundity increase of the gnat, *Bradysia odoriphaga*, induced by a sublethal dose of chlorfenapyr was also correlated to the rise of GST activity [12]. However, sublethal doses of insecticides do not always have a positive effect on physiology and behaviour of insects. Thus, contrasting effects of sublethal doses have been reported in the literature. Nevertheless, the question is how this opposite effect can be explained. Can it be only related to detoxification enzymes? Genomic, transcriptomic and proteomic analysis could help to fill this gap in our knowledge.

Changes of gene expression after exposure to sublethal dose of insecticides: is it the key event which makes the physiological difference?

The use of chemical insecticides on an increasing scale has led to the widespread development of resistance. Organisms have to adapt in order to face the toxicity of xenobiotics and to minimize negative effects on their life traits and fitness. A large amount of studies demonstrated that one of the main physiological response of insects was to up regulated the expression of genes coding for detoxification enzymes after lethal as well as sublethal exposure [11,23,24^{••},25,26]. Among the other strategies used by the insects, many cellular and molecular factors such as insecticide-induced target point mutation, subunit combination or involvement of auxiliary subunits, can modify the insecticide efficacy [27]. Exposure to a sublethal dose of insecticide doesn't seem to induce target point mutation [28^{••}] but leads to altered gene expression. For insecticides acting mainly on neuronal ion channels and receptors, changes in transcript levels of these targets could be expected in this condition. So far, the main studied target of insecticide is the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Transcriptomic studies shown that expression of genes coding for nAChR subunits was modified after a sublethal exposure to neonicotinoids [24^{••},25,29,30,31[•]]. Moreover, changes of nAChR subunit expressions were correlated to a decrease of imidacloprid sensitivity on the cockroach *Periplaneta americana* neurones [32[•]]. Cockroach dorsal unpaired median neurones expressed several nAChRs. Among them, two nAChR subtypes called nAChR1 and nAChR2 differ in their sensitivity to imidacloprid [32[•],33]. Exposure to a

sublethal dose of imidacloprid decreased the sensitivity of nAChR1 to imidacloprid without affecting subunit combination whereas this treatment modified the expression of the subunit involved in nAChR2 structure in order to optimize its function [32[•]]. Thus, insects such as cockroaches could be able to trigger adaptive mechanisms by reducing the participation of imidacloprid-sensitive nAChRs and by optimizing functional properties of nAChRs which are insensitive to this insecticide. Interestingly, it was reported in *Locusta migratoria* that transcripts of proteins interacting with nAChRs were differentially regulated when the locusts were exposed to sublethal dose of imidacloprid [24^{••}]. Among these interactive proteins, transcript of RIC-3, ubiquilin-1 and PICK1, which potentially regulated the expression and the function of nAChRs, were overexpressed [24^{••}]. Thus, expression modifications of insecticide targets as well as these of interactive proteins should be considered in the strategy of insect adaptation. However, it was also reported that sublethal exposure to neonicotinoids or spinosyns, both targeting nAChRs [1], could alter the expression of genes coding for other receptors. For instance, exposure to a sublethal dose of thiamethoxam or spinosad modify respectively the expression of NMDA glutamate receptor subunit in *Apis mellifera* [30] and the expression of GABA receptors subunits in *Plutella xylostella* [34]. These data suggest that intracellular signalling pathways could be involved when insects are exposed to sublethal dose of insecticides. Transcriptomic analysis demonstrated that, according to the insecticide used and the studied insect, more than 300 genes were differentially expressed [24^{••},30,31[•]]. Interestingly, expression of intracellular factor transcripts, well-known to modulate insecticide sensitivity such as kinases and phosphatases [27], were changed [24^{••},31[•]]. Thus, exposure to sublethal dose of insecticide can modify the insect physiological responses using changes of various intracellular factors. However, it is important to note that these factors involved in sublethal response can be different from those elicited by a lethal dose [24^{••}]. To improve pest management programs, it is necessary to know if these modifications induced by sublethal doses of insecticides can be maintained over generations.

Can modifications induced by low doses of insecticide be transgenerationally inherited?

It is acknowledged now that an adaptation to a new environment can occur through both genetic and epigenetic means across all organisms [35,36]. The rapidity of this adaptation suggests that mechanisms different from mutation can be involved [37^{••}]. Even if researches have been shown that cells are able to raise their mutagenesis level onto DNA [36], the probability to obtain the expected mutation remains too long. Therefore, the involvement of post-transcriptional and epigenetic regulations, which modify gene expression without changing the underlying DNA sequence, can be suggested.

However, our concern is to determine if these phenomena can occur after an exposure to sublethal dose of insecticides. Transcriptomic studies, described above, showed a multitude of modulated genes in that condition.

Several epigenetic mechanisms such as DNA methylations [38], histone modifications and heritable noncoding RNAs could allow activation or inhibition of genes [39,40]. It is known that the presence of DNA methylations near to the promoter region of genes is associated with gene silencing and loss of methylation induces rise of transcription whereas histone acetylations make accessible the genes for their expression [41]. The post-transcriptional regulation is a direct regulation on mRNAs by mRNA silencing. Recently, small noncoding RNAs, named microRNAs (miRNAs), have been shown to be involved in the regulation of mRNA translation by blocking or cleaving the mRNA [42].

All these types of regulation have also been found in insects [43]. Moreover, it has been demonstrated that such changes in gene expression can be transmitted to the offspring [36,44,45]. This transmission called the transgenerational epigenetic inheritance (TEI) describes the transmission of alternative functional states through multiple generations in the presence of the same genomic DNA sequence [46]. Studies demonstrated that stress and memory can be transmitted by TEI [47–49]. TEI has been also reported in insects [50] and it has been demonstrated that the epigenetic inheritance influences offspring caste fate [51]. In organisms, adult acquired transcriptomic alteration in somatic cells and this alteration is spermatogenically inherited across generations suggesting that all life experiences could be transmitted through DNA methylations [45].

In insects, few studies have been done on epigenetics and inheritance involved in adaptive mechanisms after sublethal exposure to pesticides [37**]. Most of the data came from studies using lethal dose of insecticide leading to the development of resistant insects. For instance, when the diamondback moth, *P. xylostella* larvae resistant to the pyrethroid, deltamethrin, were fed with miRNA called miR-2b-3p to rise its level into the cells, treated moth became more sensitive to deltamethrin. Indeed, the miRNA may suppress transcript levels of genes coding for detoxification enzymes [43]. Other two studies demonstrated that inhibiting histone deacetylation in *A. melifera* or activating DNA methylation in *Aedes albopictus*, both increased resistance to imidacloprid used at LC₅₀ [52,53]. Similar results were obtained using sublethal doses of insecticides. Treatment with the neonicotinoid clothianidin at sublethal dose accelerated the development of F1 generation of *Bemisia tabaci* but reduced its survival and fecundity [54]. Low dose of the neonicotinoid cycloxyprid decreased adult longevity and fecundity of *Aphis gossypii*. Indeed, transgenerational effects in offspring were to reduce adult fecundity and net

reproductive rate [55]. Study on aphids, *Myzus persicae*, shown that exposure to sublethal dose of imidacloprid reduced their sensitivity to this insecticide across four generations without affecting sensitivity to spirotetramat, another insecticide acting as lipid biosynthesis inhibitor. This result suggests a specific adaptation to one molecule which is not in line with a non-specific chemical resistance. Moreover, no mutation was found in all five subunits which compose nAChR targeted by neonicotinoids [28**]. This work demonstrated that changes induced by exposure to sublethal dose of insecticides were not linked to mutation but to epigenetic mechanisms. Thus, the mechanism offering the fastest way of adaptation and the transgenerational inheritance is the direct modulation of gene expression via epigenetics. Moreover, the transgenerational studies suggest that species, which have shorter reproductive cycles and higher reproductive rate, may promote epigenetics to trigger insecticide adaptation. In fact, faster the offspring with inherited information from parents appear, the better the next offspring of this species will adapt and then survive.

Conclusions

Exposure to sublethal dose of insecticides induced physiological modifications that could be linked to changes in gene expression levels via epigenetic mechanisms. The advantage of these mechanisms is that they are faster than genetic mutation adaptations. Moreover, epigenetic modifications can be transmitted to the offspring, offering not only faster adaptation but also a persistent adaptation across the next generations. Today, researches are still incomplete and some points have to be resolved. After exposure to sublethal dose of pesticides, mutations occurred in fungi and weed species whereas this is not seen in insects [28**]. Further studies are needed to determine under which conditions mutations can occur. Moreover, several studies have demonstrated the role of detoxification and the immune system in insecticide resistance [25,29,56,57]. Further studies should be done to determine if the immune system can play an important role in transgenerational adaptations to insecticides. In summary, different aspects of the adaptive mechanisms must be explored in order to improve pest control.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

Acknowledgements

This work was supported by INRA, la Région Pays de la Loire and the RFI objectif végétal.

References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Ffrench-Constant RH, Williamson MS, Davies TG, Bass C: **Ion channels as insecticide targets.** *J Neurogenet* 2016, **30**:163-177.

2. Casida JE: **Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: progress and prospects.** *Ann Rev Entomol* 2018, **63**:125-144.
 3. Ffrench-Constant RH: **The molecular genetics of insecticide resistance.** *Genetics* 2013, **194**:807-815.
 4. Zalucki MP, Furlong MJ: **Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence.** *Curr Opin Insect Sci* 2017, **21**:19-25.
 5. Vryzas Z: **Pesticide fate in soil-sediment-water environment in relation to contamination preventing actions.** *Curr Opin Environ Sci Health* 2018, **4**:5-9.
 6. Zheng S, Chen B, Qiu X, Chen M, Ma Z, Yu X: **Distribution and risk assessment of 82 pesticides in jiu long river and estuary in south china.** *Chemosphere* 2016, **144**:1177-1192.
 7. Fernandes MES, Alves FM, Pereira RC, Aquino LA, Fernandes FL, Zanuncio JC: **Lethal and sublethal effects of seven insecticides on three beneficial insects in laboratory assays and field trials.** *Chemosphere* 2016, **156**:45-55.
 8. Cutler GC, Guedes RNC: **Occurrence and significance of insecticide-induced hormesis in insects.** In *Pesticide Dose: Effects on the Environment and Target and Non-Target Organisms*. Edited by Duke SO, Kudsk P, Solomon K. American Chemical Society; 2017:101-119.
 9. Rix RR, Ayyanath MM, Cutler GC: **Sublethal concentrations of imidacloprid increase reproduction, alter expression of detoxification genes, and prime myzus persicae for subsequent stress.** *J Pest Sci* 2016, **89**:581-589.
 10. Xu L, Zhao CQ, Zhang YN, Liu Y, Gu ZY: **Lethal and sublethal effects of sulfoxaflor on the small brown planthopper laodelphax striatellus.** *J Asia-Pac Entomol* 2016, **19**:683-689.
 11. Lalouette L, Pottier MA, Wycke MA, Boitard C, Bozzolan F, Maria A, Demondion E, Chertemps T, Lucas P, Renault D, Maibeche M et al.: **Unexpected effects of sublethal doses of insecticide on the peripheral olfactory response and sexual behavior in a pest insect.** *Environ Sci Pollut Res Int* 2016, **23**:3073-3085.
 12. Zhao Y, Wang Q, Ding J, Wang Y, Zhang Z, Liu F, Mu W: **Sublethal effects of chlorfenapyr on the life table parameters, nutritional physiology and enzymatic properties of bradysia odoriphaga (diptera: Sciaridae).** *Pesticide Biochem Physiol* 2018, **148**:93-102.
 13. Xu C, Zhang Z, Cui K, Zhao Y, Han J, Liu F, Mu W: **Effects of sublethal concentrations of cyantraniliprole on the development, fecundity and nutritional physiology of the black cutworm agrotis ipsilon (lepidoptera: Noctuidae).** *PLoS One* 2016, **11**:e0156555.
 14. Catae AF, Roat TC, Pratavieira M, Silva Menegasso ARD, Palma MS, Malaspina O: **Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of apis mellifera (hymenoptera, apidae).** *Ecotoxicology* 2018, **27**:109-121.
 15. Feltham H, Park K, Goulson D: **Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency.** *Ecotoxicology* 2014, **23**:317-323.
 16. Peng YC, Yang EC: **Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerular density of honey bee mushroom bodies.** *Sci Rep* 2016, **6**:19298.
 17. Jacob CR, Soares HM, Nocelli RC, Malaspina O: **Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee scaptotrigona postica.** *Pest Manag Sci* 2015, **71**:114-122.
 18. Samuelson EE, Chen-Wishart ZP, Gill RJ, Leadbeater E: **Effect of acute pesticide exposure on bee spatial working memory using an analogue of the radial-arm maze.** *Sci Rep* 2016, **6**:38957.
 19. Tison L, Holtz S, Adeoye A, Kalkan O, Irmisch NS, Lehmann N, Menzel R: **Effects of sublethal doses of thiacloprid and its formulation calypso(r) on the learning and memory performance of honey bees.** *J Exp Biol* 2017, **220**:3695-3705.
 20. Alkassab AT, Kirchner WH: **Impacts of chronic sublethal exposure to clothianidin on winter honeybees.** *Ecotoxicology* 2016, **25**:1000-1010.
 21. Qu Y, Xiao D, Li J, Chen Z, Biondi A, Desneux N, Gao X, Song D: **Sublethal and hormesis effects of imidacloprid on the soybean aphid aphid glycines.** *Ecotoxicology* 2015, **24**:479-487.
 22. Roat TC, Carvalho SM, Palma MS, Malaspina O: **Biochemical response of the africanized honeybee exposed to fipronil.** *Environ Toxicol Chem* 2017, **36**:1652-1660.
 23. Xiao D, Tan X, Wang W, Zhang F, Desneux N, Wang S: **Modification of flight and locomotion performances, respiratory metabolism, and transcriptome expression in the lady beetle harmonia axyridis through sublethal pesticide exposure.** *Front Physiol* 2017, **8**:33.
 24. Wang X, Sun H, Zhang Y, Liu C, Liu Z: **Transcriptional changes in nachrs, interactive proteins and p450s in locusta migratoria manilensis (orthoptera: Acrididae) cns in response to high and low oral doses of imidacloprid.** *J Insect Sci* 2015:15.
- This article shown modifications of gene expressions in *Locusta migratoria* exposed to low and high doses of imidacloprid. Among the gene differentially expressed, the genes coding for proteins interacting with nicotinic acetylcholine receptors were upregulated after exposure at low dose.
25. Christen V, Fent K: **Exposure of honey bees (apis mellifera) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination.** *Environ Pollut* 2017, **226**:48-59.
 26. Alptekin S, Bass C, Nicholls C, Paine MJ, Clark SJ, Field L, Moores GD: **Induced thiacloprid insensitivity in honeybees (apis mellifera l.) is associated with up-regulation of detoxification genes.** *Insect Mol Biol* 2016, **25**:171-180.
 27. Raymond V, Goven D, Benzidane Y, List O, Lapiéd B: **Influence of cellular and molecular factors on membrane target sensitivity to insecticides.** *Curr Med Chem* 2017, **24**:2974-2987.
 28. Rix RR, Cutler GC: **Does multigenerational exposure to hormetic concentrations of imidacloprid precondition aphids for increased insecticide tolerance?** *Pest Manag Sci* 2018, **74**:314-322.
- This study demonstrated that sublethal dose of imidacloprid induced an adaptation of aphids over four generations without mutation onto the genes which compose the nicotinic acetylcholine receptors.
29. Christen V, Mittner F, Fent K: **Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (apis mellifera).** *Environ Sci Technol* 2016, **50**:4071-4081.
 30. Shi TF, Wang YF, Liu F, Qi L, Yu LS: **Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honey bees (hymenoptera: Apidae).** *J Econ Entomol* 2017, **110**:2283-2289.
 31. Wu MC, Chang YW, Lu KH, Yang EC: **Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage.** *Insect Biochem Mol Biol* 2017, **88**:12-20.
- This article are based on whole transcriptomic analysis to identify down or up regulated genes induced by sublethal exposure of imidacloprid in bee larvae. An exhaustive and informative list of all regulated genes is built.
32. Benzidane Y, Goven D, Abd-Ella AA, Deshayes C, Lapiéd B, Raymond V: **Subchronic exposure to sublethal dose of imidacloprid changes electrophysiological properties and expression pattern of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in insect neurosecretory cells.** *Neurotoxicology* 2017, **62**:239-247.
- In this study, exposure of cockroaches *Periplaneta americana* to a sublethal dose of imidacloprid, differently affect electropharmacological properties and subunit expression pattern of DUM neuron nicotinic acetylcholine receptors, which thereby impact their physiological functions.
33. Sun H, Liu Y, Li J, Cang X, Bao H, Liu Z: **The potential subunits involved in two subtypes of alpha-bgt-resistant nachrs in cockroach dorsal unpaired median (dum) neurons.** *Insect Biochem Mol Biol* 2017, **81**:32-40.
 34. Yin XH, Wu QJ, Zhang YJ, Long YH, Wu XM, Li RY, Wang M, Tian XL, Jiao XG: **Analysis of persistent changes to gamma-aminobutyric acid receptor gene expression in pluteella**

- xylostella subjected to sublethal amounts of spinosad.** *Genet Mol Res: GMR* 2016;15.
35. Elhamamsy AR: **DNA methylation dynamics in plants and mammals: overview of regulation and dysregulation.** *Cell Biochem Funct* 2016, **34**:289-298.
 36. Xue Y, Acar M: **Mechanisms for the epigenetic inheritance of stress response in single cells.** *Curr Genet* 2018 <http://dx.doi.org/10.1007/s00294-018-0849-1>.
 37. Brevik K, Lindstrom L, McKay SD, Chen YH: **Transgenerational effects of insecticides-implications for rapid pest evolution in agroecosystems.** *Curr Opin Insect Sci* 2018, **26**:34-40.
- This review report that epigenetic modifications which are due to xenobiotic stress, are heritable to germ lines and insecticide-induced effects can be transgenerationally inherited
38. Zhang H, Lang Z, Zhu JK: **Dynamics and function of DNA methylation in plants.** *Nat Rev Mol cell Biol* 2018, **19**:489-506.
 39. Lawrence M, Daujat S, Schneider R: **Lateral thinking: how histone modifications regulate gene expression.** *Trends Genet: TIG* 2016, **32**:42-56.
 40. Burggren WW: **Epigenetics in insects: Mechanisms, phenotypes and ecological and evolutionary implications.** In *Insect Epigenetics*. Edited by Verlinden H. Academic Press; 2017:1-30.
 41. Allis CD, Jenuwein T: **The molecular hallmarks of epigenetic control.** *Nat Rev Genet* 2016, **17**:487-500.
 42. Denzler R, McGearry SE, Title AC, Agarwal V, Bartel DP, Stoffel M: **Impact of microrna levels, target-site complementarity, and cooperativity on competing endogenous rna-regulated gene expression.** *Mol Cell* 2016, **64**:565-579.
 43. Etebari K, Afrad MH, Tang B, Silva R, Furlong MJ, Asgari S: **Involvement of microrna mir-2b-3p in regulation of metabolic resistance to insecticides in plutella xylostella.** *Insect Mol Biol* 2018, **27**:478-491.
 44. Houry-Ze'evi L, Korem Y, Sheftel H, Faigenbloom L, Toker IA, Dagan Y, Awad L, Degani L, Alon U, Rechavi O: **A tunable mechanism determines the duration of the transgenerational small rna inheritance in C. elegans.** *Cell* 2016, **165**:88-99.
 45. Chalker DL: **Transgenerational inheritance: Parental guidance suggested.** *Curr Biol: CB* 2018, **28**:702-704.
 46. Heard E, Martienssen RA: **Transgenerational epigenetic inheritance: Myths and mechanisms.** *Cell* 2014, **157**:95-109.
 47. Seong KH, Li D, Shimizu H, Nakamura R, Ishii S: **Inheritance of stress-induced, atf-2-dependent epigenetic change.** *Cell* 2011, **145**:1049-1061.
 48. Dias BG, Ressler KJ: **Pacap and the pac1 receptor in post-traumatic stress disorder.** *Neuropsychopharmacology* 2013, **38**:245-246.
 49. D'Urso A, Brickner JH: **Epigenetic transcriptional memory.** *Current Genet* 2017, **63**:435-439.
 50. Xing Y, Shi S, Le L, Lee CA, Silver-Morse L, Li WX: **Evidence for transgenerational transmission of epigenetic tumor susceptibility in drosophila.** *PLoS Genet* 2007, **3**:1598-1606.
 51. Matsuura K, Mizumoto N, Kobayashi K, Nozaki T, Fujita T, Yashiro T, Fuchikawa T, Mitaka Y, Vargo EL: **A genomic imprinting model of termite caste determination: Not genetic but epigenetic inheritance influences offspring caste fate.** *Am Nat* 2018, **191**:677-690.
 52. Hu YT, Wu TC, Yang EC, Wu PC, Lin PT, Wu YL: **Regulation of genes related to immune signaling and detoxification in apis mellifera by an inhibitor of histone deacetylation.** *Sci Rep* 2017, **7**:41255.
 53. Oppold A, Kress A, Vanden Bussche J, Diogo JB, Kuch U, Oehlmann J, Vandegehuchte MB, Muller R: **Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the asian tiger mosquito aedes albopictus.** *Ecotoxicol Environ Saf* 2015, **122**:45-53.
 54. Fang Y, Wang J, Luo C, Wang R: **Lethal and sublethal effects of clothianidin on the development and reproduction of bemisia tabaci (hemiptera: Aleyrodidae) med and meam1.** *J Insect Sci* 2018, **18**.
 55. Yuan HB, Li JH, Liu YQ, Cui L, Lu YH, Xu XY, Li Z, Wu KM, Desneux N: **Lethal, sublethal and transgenerational effects of the novel chiral neonicotinoid pesticide cycloxaprid on demographic and behavioral traits of aphid gossypii (hemiptera: Aphididae).** *Insect Sci* 2017, **24**:743-752.
 56. Pamminer T, Botías C, Goulson D, Hughes WOH: **A mechanistic framework to explain the immunosuppressive effects of neurotoxic pesticides on bees.** *Funct Ecol* 2018 <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2435.13119>.
 57. Brandt A, Gorenflo A, Siede R, Meixner M, Buchler R: **The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (apis mellifera l.).** *J Insect Physiol* 2016, **86**:40-47.

Étude 2 : Caractérisation des récepteurs ionotropes de la famille des « Cys-loop » chez la blatte *P. americana*

La caractérisation des « Ligand-Gated Ion Channels » (LGIC) de la famille des Cys-loop exprimés chez les insectes est d'un intérêt primordial dans la lutte contre les ravageurs de culture et les insectes vecteurs de maladie. La blatte américaine *P. americana* et la blatte germanique *B. germanica* sont considérées comme des insectes nuisibles dans le milieu urbain. En effet, ces insectes sont porteurs de nombreux pathogènes qui peuvent se retrouver dans les denrées alimentaires provoquant ainsi des infections chez l'homme. De plus, ces blattes peuvent déclencher des réactions allergiques favorisant l'apparition d'asthme. Le contrôle de l'infestation de ces insectes passe par l'utilisation d'insecticides neurotoxiques ayant pour cibles principales des enzymes, des récepteurs ou bien encore des canaux ioniques. L'étude du mode d'action des insecticides sur des neurones provenant de blattes *P. americana* a permis d'accroître nos connaissances sur certains LGIC présents dans le SNC de ces insectes. À ce jour, seuls les récepteurs GABA de la blatte *B. germanica* et les récepteurs nicotiques de la blatte *P. americana* avec l'identification de 8 sous-unités nicotiques ont été en partie caractérisés. Ainsi, la caractérisation complète des LGIC chez ces blattes représente une étape cruciale dans l'identification des éléments clés du SNC et des cibles moléculaires des insecticides. Dans cette étude, la diversité des récepteurs LGIC a été établie pour la 1^{ère} fois chez *Periplaneta americana* et *Blattella germanica*. À l'image de ce qu'il peut être retrouvé chez les autres insectes, il a été identifié chez ces blattes des récepteurs nicotiques, GABA, GluCl, HisCl ainsi que des récepteurs sensibles au pH (pHCl). De plus, ces 2 espèces de blattes présentent un nombre important de sous-unités nicotiques divergentes, allant de 8 sous-unités pour la blatte *B. germanica* à 10 pour la blatte *P. americana*. Les phénomènes d'épissage alternatif ainsi que l'édition d'ARN ont été retrouvés chez ces deux espèces. Ces mécanismes participent donc à l'augmentation de la diversité de la superfamille des récepteurs cysLoop, décrite comme la plus importante à ce jour. Ces résultats conduisent à une meilleure compréhension de l'évolution de la superfamille des LGIC chez les insectes et fournissent une base essentielle i) pour l'étude de leur fonction, ii) pour l'étude des mécanismes de résistances aux insecticides et iii) dans la lutte contre ces insectes nuisibles.

Cette étude est issue d'une collaboration avec le laboratoire d'Andrew Jones de l'Université d'Oxford Brookes (GB). Les analyses bio-informatiques ont été réalisées par A. Jones et l'analyse de l'expression des différents LGIC dans le SNC de la blatte *P americana* par le laboratoire SiFCIR.

“The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamilies of the cockroaches *Blattella germanica* and *Periplaneta americana*”, *Pest Management Science* (En révision mineure)

Andrew Jones¹, Delphine Goven², Josy-Anne Froger², Alexandre Bantz², Valérie Raymond²

Partie 3 : Résultat – Etude 2

1 : Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Health and Life Sciences, Oxford Brookes University, Royaume-Uni

2 : Laboratoire SiFCIR, (SiFCIR), UPRES-EA2647 USC INRAE 1330 SFR 4207 QUASAV, Faculté des Sciences, Université d'Angers, France



**The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamilies of
the cockroaches *Blattella germanica* and *Periplaneta
americana***

Journal:	<i>Pest Management Science</i>
Manuscript ID	PM-20-1036
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	02-Sep-2020
Complete List of Authors:	Jones, Andrew; Oxford Brookes University, Biological and Medical Sciences Goven, Delphine; University of Angers, UFR Sciences Froger, Josy-Anne; University of Angers, UFR Sciences Bantz, Alexandre; University of Angers, UFR Sciences Raymond, Valerie; University of Angers, UFR Sciences
Key Words:	cockroach, cys-loop ligand-gated ion channel, <i>Blattella germanica</i> , <i>Periplaneta americana</i> , nicotinic acetylcholine receptor, GABA receptor, glutamate-gated chloride channel, histamine-gated chloride channel, insecticide target

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 1 **The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamilies of the cockroaches *Blattella germanica***
4
5 2 **and *Periplaneta americana***

6
7
8 3 Running Title: Cockroach ligand-gated ion channel genes
9

10
11 4 **Andrew K Jones¹, Delphine Goven², Josy-Anne Froger², Alexandre Bantz² and Valerie Raymond²**

12
13
14 5 ¹Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of Health and Life Sciences, Oxford Brookes
15
16 6 University, Oxford, OX3 0BP, UK

17
18
19 7 ²Laboratoire « Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et Récepteurs » (SiFCIR), UPRES-
20
21 8 EA2647 USC INRAE 1330, SFR 4207 QUASAV, UFR Sciences, Université d'Angers, 2 Bld Lavoisier,
22
23 9 49045 Angers Cedex 01, France

24
25
26 10 Corresponding author: Andrew Jones; Department of Biological and Medical Sciences, Faculty of
27
28 11 Health and Life Sciences, Oxford Brookes University, Oxford, OX3 0BP, UK; +44 (0)1865 483602;
29
30 12 a.jones@brookes.ac.uk

31
32
33 13 Email addresses: Alexandre Bantz, alexandre.bantz@univ-angers.fr; Josy-Anne Froger, josy-
34
35 14 anne.froger@univ-angers.fr; Delphine Goven, delphine.goven@univ-angers.fr; Valerie Raymond,
36
37 15 valerie.raymond@univ-angers.fr

38
39
40
41 16 This manuscript is intended to be included in the Pest Management Science special issue based on
42
43 17 the Fall 2019 ACS AGRO symposia honouring Vincent Salgado for the International Award and Tom
44
45 18 Sparks for the Kenneth A. Spencer Award.

1
2
3 **19 Abstract**
4
5

6 **20 BACKGROUND:** Cockroaches are serious urban pests that can transfer disease-causing
7
8 **21** microorganisms as well as trigger allergic reactions and asthma. They are commonly managed by
9
10 **22** pesticides that act on cys-loop ligand-gated ion channels (cysLGIC). To provide further information
11
12 **23** that will enhance our understanding of how insecticides act on their molecular targets in
13
14 **24** cockroaches, we used genome and reverse transcriptase PCR data to characterise the cysLGIC gene
15
16 **25** superfamilies from *Blattella germanica* and *Periplaneta americana*.
17
18
19

20 **26 RESULTS:** The *B. germanica* and *P. americana* cysLGIC superfamilies consist of 30 and 32 subunit-
21
22 **27** encoding genes, respectively, which are the largest insect cysLGIC superfamilies characterized to
23
24 **28** date. As with other insects, the cockroaches possess ion channels predicted to be gated by
25
26 **29** acetylcholine, gamma-amino butyric acid, glutamate and histamine, as well as orthologues of the
27
28 **30** *Drosophila* pH-sensitive chloride channel (pHCl), CG8916 and CG12344. The large cysLGIC
29
30 **31** superfamilies of cockroaches are a result of an expanded number of divergent nicotinic acetylcholine
31
32 **32** receptor subunits, with *B. germanica* and *P. americana* respectively possessing eight and ten subunit
33
34 **33** genes. Diversity of the cockroach cysLGICs is also broadened by alternative splicing and RNA A-to-I
35
36 **34** editing. Unusually, both cockroach species possess a second glutamate-gated chloride channel as
37
38 **35** well as another CG8916 subunit.
39
40
41

42 **36 CONCLUSION:** These findings on *B. germanica* and *P. americana* enhance our understanding of the
43
44 **37** evolution of the insect cysLGIC superfamily and provide a useful basis for the study of their function,
45
46 **38** the detection and management of insecticide resistance, and for the development of improved
47
48 **39** pesticides with greater specificity towards these major pests.
49
50
51

52 **40** **Keywords:** cockroach, *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, cys-loop ligand gated ion channel,
53
54 **41** insecticide target, nicotinic acetylcholine receptor
55
56
57

58 **42**
59
60

1 INTRODUCTION

We are delighted to be contributing a paper as part of a special issue honouring Vincent Salgado and Tom Sparks. In working on insecticides we have naturally come across both Tom's and Vincent's studies and the resulting wealth of information investigating the actions of various compounds. In the process of developing our research careers, 'Salgado' and 'Sparks' have struck us as big names in the field, whose work is influential, inspirational and aspirational in helping us to push forwards in our investigations. We hope that the following study, characterizing molecular targets of insecticides at the genomic and transcript level, will complement well the more functional aspect of Tom's and Vincent's work.

In insects, members of the cys-loop ligand ion channel (cysLGIC) superfamily mediate both fast excitatory and inhibitory synaptic transmission in the nervous system and may also be performing non-neuronal roles.¹ The superfamily includes cation-permeable nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs),² γ -amino butyric acid (GABA)-gated ion channels³ as well as chloride channels gated by glutamate (GluCls),⁴ histamine^{5, 6} or zinc.⁷ Insect cysLGICs are of considerable interest as they are targets of effective pesticides.⁸ For example, nAChRs are targets of neonicotinoids and spinosyns,^{9, 10} GABA receptors are targets of fiproles and isoxazolines¹¹ whilst avermectins act mainly on GluCls.⁴

Cockroaches are serious urban pests that can transfer disease-causing microorganisms as well as trigger allergic reactions and asthma.¹² Management of cockroaches is heavily reliant on the use of insecticides, including the neonicotinoids imidacloprid and dinotefuran, fipronil and abamectin, in bait formulations.¹³ There have been reports of cockroaches showing resistance to insecticidal bait containing fipronil, abamectin and imidacloprid¹⁴⁻¹⁶ highlighting the need for improved knowledge of resistance mechanisms and detection as well as the development of novel control agents. The use of cockroach neurons have resulted in many instructive studies investigating the actions of insecticides on cysLGICs in the insect nervous system.¹⁷⁻²³ To date, several cockroach

1
2
3 68 cysLGIC subunit sequences have been reported. These include the nAChR subunits $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$,
4
5 69 $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ and $\beta 1$ from *Periplaneta americana*.^{22, 24, 25} Also, fragments of *Rdl* from *Blattella*
6
7 70 *germanica* were analyzed in order to investigate the basis of cyclodiene resistance.²⁶ Characterizing
8
9 71 the full complement of cockroach cys-loop LGIC subunits represents a critical step in identifying key
10
11 72 components of the cockroach nervous system as well pinpointing particular molecular targets
12
13 73 underlying responses to insecticides. Here we have used genome sequences of *B. germanica*²⁷ and *P.*
14
15 74 *americana*¹² as well as reverse transcriptase PCR to provide descriptions of their complete cys-loop
16
17 75 LGIC gene superfamilies.
18
19
20
21
22 76

27 77 **2 MATERIALS AND METHODS**

28 78 **2.1 Identification of cysLGIC subunits from *B. germanica* and *P. americana***

29
30 79 To identify putative cockroach cysLGIC subunits, we used tBLASTn²⁸ to screen the *B. germanica*
31
32 80 genome assembly or transcript sequences (available at the United States Department of Agriculture
33
34 81 <https://i5k.nal.usda.gov/webapp/blast/>) and the *P. americana* genome or transcript sequences
35
36 82 (available at the NCBI National Center for Biotechnology Information
37
38 83 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) with every member of the *Acyrtosiphon pisum* or *Tribolium*
39
40 84 *castaneum* cysLGIC superfamilies.^{29, 30} Candidate cockroach cysLGIC subunits were identified based
41
42 85 on their considerable sequence homology with previously characterized subunits particularly in the
43
44 86 N-terminal ligand-binding domain and the four transmembrane regions. In some cases, the
45
46 87 cockroach cysLGIC sequences were corrected based on protein sequence alignments or reverse-
47
48 88 transcriptase PCR sequence data (see Supporting information Table 1).
49
50
51
52

53 89 **2.2 Insects**

54
55
56 90 Adult male cockroach *P. americana* used for RT-PCR experiments were maintained under standard
57
58 91 laboratory conditions (28 °C with 12 h light / 12 h dark photo-cycle, food and water *ad libitum*).
59
60

92 **2.3 Reverse transcription polymerase chain reaction**

93 To study *cysLGIC* subunits expressed in the *P. americana* central nervous system and confirm coding
94 sequences identified in the cockroach genome, RT-PCR was carried out on the terminal abdominal
95 ganglion (TAG), which was removed from the nerve cord of cockroaches as previously described in
96 Benzidane *et al.*²² The Nucleospin RNA kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) was used to extract
97 total RNA from TAG following the manufacturer's instructions and 500 ng of sodium acetate/ethanol
98 purified RNA was reverse transcribed using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit
99 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The PCR amplification reactions were performed with
100 KOD hot start polymerase (Novagen) and specific *cysLGIC* primer sets (see Supporting information
101 Table 2) using the following thermocycling conditions: 2 min at 95°C then 35 cycles of 20 sec at 95°C,
102 10 sec at optimal annealing temperature of primers (between 50 to 65°C) and 20 sec/kb at 70°C
103 before being held at 10°C. The PCR products were finally purified using NucleoSpin Gel and PCR
104 clean-up kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) then sequenced (Eurofins).

105 **2.4 Sequence analysis**

106 The multiple protein sequence alignments were constructed with Clustal X³¹ using the slow-
107 accurate mode with a gap-opening penalty of 10 and a gap-extension penalty of 0.1 and applying the
108 Gonnet 250 protein weight matrix. The protein alignments were viewed using GeneDoc
109 (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>), which was also used to calculate identity and
110 similarity values between subunit sequences. Signal-peptide cleavage sites were predicted using the
111 SignalP 3.0 server³² and membrane-spanning regions were predicted using the TMPred program
112 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). The PROSITE database³³ was used to
113 identify potential N-glycosylation and phosphorylation sites.

114 Phylogenetic trees were constructed with MEGAX software³⁴ using the Maximum Likelihood method
115 and Dayhoff matrix based model. The tree with the highest log likelihood after 1000 bootstrap
116 replications is shown.

117

3 RESULTS**3.1 The *B. germanica* and *P. americana* cysLGIC superfamilies consist of 30 and 32 subunit members, respectively**

Using tBLASTn, 30 and 32 cysLGIC subunit genes were identified in the genomes of *B. germanica* and *P. americana*, respectively. These are notably large insect cysLGIC superfamilies considering that the previously identified superfamilies from genomes of *Drosophila melanogaster*,³⁵ *Apis mellifera*,³⁶ *Tribolium castaneum*,³⁰ *Nasonia vitripennis*,³⁷ *Acyrtosiphon pisum*,²⁹ *Aedes aegypti*³⁸ and *Aethina tumida*³⁹ consist of 21-26 genes.¹ An alignment of *P. americana* protein sequences shows that the cockroach subunits possess features characteristic to members of the cysLGIC superfamily⁴⁰ (Figures 1 and 2). These include: (i) an extracellular N-terminal domain containing distinct regions (loops A–F) that form the ligand-binding site;⁴¹ (ii) the dicysteine loop (cys-loop) consisting of two disulphide bond-forming cysteines separated by 13 amino-acid residues; (iii) four transmembrane regions (TM1–4); (iv) a highly variable intracellular loop between TM3 and TM4. As with other cysLGIC subunits, the cockroach sequences also possess potential N-glycosylation sites in the extracellular N-terminal domain, which can affect receptor maturation, channel desensitization and conductance,⁴² and putative phosphorylation sites in the TM3–TM4 intracellular loop, which regulates several aspects of receptor function such as desensitization, aggregation and conformation changes.^{44–46}

A comparison of sequence identities between *P. americana* and *T. castaneum* cysLGIC subunits (Tables 1 and 2), as well as the use of phylogenetic trees (Figures 3, 4 and 5), indicate orthologous relationships between the cockroach, beetle and aphid (*A. pisum*) subunits. In order to maintain consistent nomenclature and to facilitate comparisons between different insect species, cockroach subunits were named after their *Tribolium* counterparts.³⁰ For example, the *B. germanica* or *P. americana* orthologues of *Tribolium* nAChR α 1, RDL and CG12344 were designated Bger α 1, BgerRDL, Bger12344 or Pame α 1, PameRDL, Pame12344, respectively. Phylogenetic analysis indicates

1
2
3 142 that an early duplication event lead to one branch evolving into the nAChR subunits whilst the other
4
5 143 branch generated the remaining subunits (Figure 3).
6
7

8 144 **3.2 Cockroach nicotinic acetylcholine receptor subunits**

9
10
11 145 In the genomes of *B. germanica* and *P. americana*, 17 and 19 candidate nAChR-subunit encoding
12
13 146 genes were identified, respectively (Figures 1, 3 and 4). This is larger than other insect nAChR gene
14
15 147 families described, such as from *D. melanogaster* (10 subunits),⁴⁷ *Anopheles gambiae* (10),⁴⁸ *A.*
16
17 148 *mellifera* (11),⁴⁹ *A. tumida* (12),³⁹ *A. pisum* (11),⁵⁰ *Bombyx mori* (12),⁵¹ *T. castaneum* (12),³⁰ *Ae.*
18
19 149 *aegypti* (14)³⁸ and *N. vitripennis* (16).³⁷ Both *B. germanica* and *P. americana* possess typical core
20
21 150 groups of nAChR subunits that are highly conserved in different insect species,² these being α 1- α 8
22
23 151 and β 1 (Figure 4). As is the case for $D\alpha$ 1, $D\alpha$ 2, $D\alpha$ 3, $D\alpha$ 4, $D\beta$ 2 and their orthologues in other insect
24
25 152 species,² the corresponding cockroach subunits (α 1-4 and α 8) have an insertion in loop F (Figure 1),
26
27 153 which may contribute to interactions with the neonicotinoid, imidacloprid.⁵² The *Bger* α 1, *Bger* α 2
28
29 154 and *Bger* α 8 genes are located within 686 kb of each other, although not as tightly clustered together
30
31 155 as the corresponding genes in the *D. melanogaster* ($D\alpha$ 1, $D\alpha$ 2 and $D\beta$ 2) and *An. gambiae* (*Agama*1,
32
33 156 *Agama*2 and *Agama*8) genomes, where they are found within 220 kb.⁴⁸ It is unknown whether the
34
35 157 orthologous genes in *P. americana* are similarly arranged as its genome is still at scaffold assembly
36
37 158 stage and the scaffolds are not of sufficient length to determine whether they are in proximity to
38
39 159 each other. The *Pame* α 7 and *Pame* β 1 subunits, however, as well as *Bger* α 7 and *Bger* β 1, were found
40
41 160 within 420 kb of each other. Clustering of the equivalent subunits have also been seen in the
42
43 161 genomes of *A. mellifera*, *An. gambiae* and *T. castaneum*.^{30, 48, 49} RT-PCR of *P. americana* cDNA
44
45 162 generated amplification products of all the core group subunits, indicating that these subunits are
46
47 163 transcribed in cockroaches.
48
49
50
51
52
53

54 164 *B. germanica* and *P. americana* possess eight and ten divergent nAChR subunits,
55
56 165 respectively. This is notably larger than in other genomes such as those of *Ae. aegypti*, *An. gambiae*,
57
58 166 *A. mellifera*, *A. pisum*, *A. tumida*, *B. mori*, *D. melanogaster*, *T. castaneum* and *N. vitripennis*, which
59
60

1
2
3 167 possess between 1 and 7 divergent subunit genes.^{30, 37-39, 47-51} Of the divergent nAChR subunits
4
5 168 present in *B. germanica*, two are of the α subtype and six are β whereas there are one α and nine β
6
7 169 in the *P. americana* genome (Figures 3 and 4). As with one of the Tribolium divergent subunits,
8
9 170 Tcasa9, Bger α 10 possesses an atypical FxCC amino-acid motif (Supporting information Table 1),
10
11 171 instead of the highly conserved YxCC found in loop C, which may result in unusual ligand-binding
12
13 172 properties.⁵³ In addition, the cockroach divergent subunits, with the exception of α 9, lack the GEK
14
15 173 motif characteristic of nAChR subunits, which precedes TM2 (Figure 1), and has an important role in
16
17 174 ion permeation and selectivity.⁵⁴ This raises the possibility that these subunits may form nAChRs
18
19 175 with distinct ion channel characteristics. As is common for insect divergent nAChR subunits, several
20
21 176 cockroach subunit genes are found clustered together in the genome indicating recent gene
22
23 177 duplication events. Thus, Bger α 10 and Bger β 7 are found within 63 kb of each whilst Pame β 7 and
24
25 178 Pame β 9 are located within 53 kb. Also, Bger β 3, Bger β 4, Bger β 5 and Bger β 6 are all found within 50
26
27 179 kb whereas an extra duplication event appears to have expanded this gene cluster in *P. americana*
28
29 180 where Pame β 3, Pame β 4, Pame β 5, Pame β 6 and Pame β 8 are all located within 50 kb. RT-PCR
30
31 181 amplification products were seen for the of *P. americana* divergent nAChR subunits (except for β 7,
32
33 182 β 9 and β 10), indicating that several of the cockroach divergent nAChRs are expressed.
34
35
36
37
38
39

40 183 Bger α 4, Pame α 4, Bger α 6 and Pame α 6 have alternatively spliced exons, which are common
41
42 184 to insect α 4 and α 6 subunits.² Thus, Bger α 4 and Pame α 4 possesses two alternatives for exon 4
43
44 185 (denoted exon4 and exon4')⁵⁵ (Figure 6A), which introduces variation in LoopE and the cys-loop.
45
46 186 Similar to α 6 in *T. castaneum* and other species,³⁰ Bger α 6 and Pame α 6 have two alternatives for
47
48 187 exon 3 and three alternatives for exon 8 (Figure 6B). Bger α 7 and Pame α 7 also have alternative
49
50 188 splicing for exons 7 and 8 (Figure 6C), which, so far, has only been reported for the aphid, *A. pisum*.⁵⁰
51
52 189 Here, there are two alternatives for exon 7 in the aphid and cockroach genomes, which introduces
53
54 190 variation in Loop C and the first transmembrane domain. Exon 7b of Bger α 7 and Pame α 7 differ by
55
56 191 one amino acid in the region between Loop C and TM1, with a valine being present in *P. americana*
57
58
59
60

1
2
3 192 and a tyrosine in *B. germanica*. Bger α 7 and Pame α 7 also have four alternatives for exon 8 (Figure
4
5 193 6C) whereas *A. pisum* has three, at a site equivalent to splicing of exon 8 and in the α 6 subunit
6
7 194 (Figure 6B), which introduces variation in or near the second transmembrane domain.
8
9

10 195 In analyzing sequences of *P. americana* nAChR subunits amplified by RT-PCR, potential RNA
11
12 196 A-to-I editing in α 6 was detected as indicated by adenosine in the genomic DNA sequence being
13
14 197 replaced by guanosine in the cDNA sequence (Figure 6D). This results in the recoding of two amino
15
16 198 acid residues within Loop E, effectively removing a putative N-glycosylation site, which is frequently
17
18 199 affected by RNA editing in α 6 of other species such as *T. castaneum* (Figure 6D).^{2, 30}
19
20
21

22 200 **3.3 Cockroach GABA receptor subunits**

23
24
25 201 The genomes of *B. germanica* and *P. americana* contain orthologues of the three known *D.*
26
27 202 *melanogaster* GABA-gated ion channels, RDL, GRD and LCCH3 (Figures 3 and 5, Table 2).^{3, 56} As it is
28
29 203 the case for other species, cockroach RDL possesses a PAR sequence before TM2 (Figure 2) which is
30
31 204 important for forming anion channels,⁵⁴ whereas cockroach GRD and LCCH3 lack this sequence,
32
33 205 consistent with *Drosophila* GRD and LCCH3 forming cation-permeable channels when expressed in
34
35 206 oocytes of *Xenopus laevis*.⁵⁷
36
37
38

39 207 The *Rdl* genes of *B. germanica* and *P. americana* have alternative splicing, similar to that of
40
41 208 many other species such as *D. melanogaster*,⁵⁸ *T. castaneum*,³⁰ *A. mellifera*³⁶ and *A. pisum*,²⁹ where
42
43 209 there are two alternatives for exons 3 and 6 (Figure 7A). Exon 6a of Bger RDL and Pame RDL differ by
44
45 210 one amino acid, in Loop F, with a threonine being present in *P. americana* and an isoleucine in *B.*
46
47 211 *germanica*. In addition, two alternatives for exon 9 in Bger RDL were detected, which introduces
48
49 212 variation at the C-terminal end of the protein, including TM4 (Figure 7A). Alternative splicing of this
50
51 213 exon has so far only been reported for the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*.⁵⁹ Exon 9
52
53 214 of *Rdl* in the genome and transcriptome of *P. americana* was not observed to have alternatively
54
55 215 spliced variants. Analysis of RNA-seq data identified two variants of *P. americana* *Rdl* (variant 1 and
56
57 216 2) with different length intracellular loops between TM3 and TM4 (Figure 7B) arising from
58
59
60

1
2
3 217 differential use of gt splice donor sites. Variant 2 has an insertion of 21 amino acid residues, which
4
5 218 disrupts a putative protein kinase C phosphorylation site. Insertion of amino acids at this site has
6
7 219 been seen in RDL of diverse species including *A. mellifera*⁶⁰ and the miridbug, *Cyrtorhinus*
8
9 220 *lividipennis*,⁶¹ although the actual sequence inserted is species-specific.
10
11
12

13 221 **3.4 Cockroach GluCl s and HisCl s**

14
15 222 *B. germanica* and *P. americana* possess two HisCl genes, HisCl1 and HisCl2 (Figures 3 and 5, Table2),
16
17 223 which are highly conserved in diverse insect species such as *D. melanogaster*,^{5,6} *A. mellifera*,³⁶ *T.*
18 224 *castaneum*,³⁰ *A. pisum*²⁹ and the butterfly *Papilio Xuthus*.⁶² *B. germanica* and *P. americana* also
19
20 225 possess a GluCl gene, which again, is highly conserved amongst insects.^{4, 37, 63} This includes
21
22 226 alternative splicing where two alternatives for exon 3 has been observed for *B. germanica* and *P.*
23
24 227 *americana* GluCl s (Figure 7C). When compared to the three splice variants identified in *T. castaneum*
25
26 228 GluCl,³⁰ *B. germanica* and *P. americana* GluCl exon3a was identical to Tribolium exon3a whilst the
27
28 229 second cockroach variant (here denoted exon 3b) was most similar to Tribolium exon 3c (Figure 7B).
29
30 230 Exon 3b of Bger GluCl and Pame GluCl differ by one amino acid with an isoleucine being present in *P.*
31
32 231 *americana* and a tyrosine in *B. germanica*.
33
34
35
36
37
38

39 232 As with *A. pisum*,²⁹ a second putative GluCl gene was found in the genomes of *B. germanica*
40
41 233 and *P. americana*, which were tentatively denoted as Bger GluCl2 or Pame GluCl2, respectively, since
42
43 234 when compared to Tribolium cysLGIC subunits, they shared highest sequence identity with Tcas
44
45 235 GluCl at 33% (Table 2). This level of identity did not change when considering only the N-terminal
46
47 236 extracellular domains without the signal peptide. Phylogenetic analysis shows that the cockroach
48
49 237 GluCl2 subunits do not appear to be closely related to GluCl s in other species (Figure 5) although
50
51 238 Bger GluCl2 and Pame GluCl2 do cluster with Apisum GluCl2 sharing a considerably high amino acid
52
53 239 identity of 81%. Analysis of RT-PCR data of *P. americana* cDNA confirmed that GluCl2 is transcribed.
54
55
56

57 240 **3.5 Cockroach pHCl s and other cys-loop LGIC s**

1
2
3 241 The *B. germanica* and *P. americana* genomes possess an orthologue of the pH-sensitive chloride
4
5 242 channel (Figure 5 and Table 2), which was first identified in *Drosophila*.⁶⁴ The cockroach genomes
6
7 243 also clearly possess orthologues of *Drosophila* CG8916 and CG12344 (Figure 5 and Table 2), the
8
9 244 latter of which may be involved in mediating responses to glycine.⁶⁵ *B. germanica* and *P. americana*
10
11 245 genomes possess two subunits (CLGC1 and CLGC2, Figure 5) belonging to the Insect Group 1 of cys-
12
13 246 loop LGIC subunits.³⁰ Initially identified in *D. melanogaster* as CG6927, CG7589 and CG11340,⁶⁶
14
15 247 members of this group generally show unclear orthologous relationships between species (Table 2)
16
17 248 and are amongst the least studied insect cysLGICs.¹ However recently, it has been shown that
18
19 249 *Drosophila* CG11340, referred to as *hodor*, encodes for a zinc-gated chloride channel.⁷ As with the
20
21 250 cockroaches, *A. pisum* has two subunits in this group²⁹ whereas *T. castaneum* has three (Figure 5)³⁰
22
23 251 and *A. mellifera* has one.³⁶

24
25
26
27
28 252 Interestingly, an additional cysLGIC subunit gene was found in the genomes of *B. germanica*
29
30 253 and *P. americana*. Phylogenetic analysis suggests that this subunit is most closely related to GRD or
31
32 254 8916 in other species (Figure 5) sharing comparable levels of identity and similarity with *Tribolium*
33
34 255 GRD and 8916 (Table 2). Evolutionary distance estimates suggests that it is more closely related to
35
36 256 *Tribolium* 8916 (Supporting information Table 3), therefore this subunit was tentatively denoted as
37
38 257 Bger 8916_2 or Pame 8916_2.

39 40 41 42 258 **4 DISCUSSION**

43 44 45 259 **4.1 Cockroaches have unusually large cysLGIC gene superfamilies**

46
47
48 260 Cockroaches are pests of urban environments and are commonly managed by pesticides such as
49
50 261 fipronil, imidacloprid, dinotefuran and abamectin,¹³ which target members of the cysLGIC
51
52 262 superfamily.^{4, 9, 11} Here, we have used the available genome sequences of *B. germanica* and *P.*
53
54 263 *americana*^{12, 27} to characterize the complete cysLGIC gene superfamilies from these major pests.
55
56 264 Consisting of 30 and 32 subunit genes, *B. germanica* and *P. americana*, respectively, possess the
57
58 265 largest insect cysLGIC superfamilies so far characterized. Transcriptome analysis of complete and

1
2
3 266 partial transcripts has suggested that the locust, *Locusta migratoria manilensis*, may have an even
4
5 267 more extensive cysLGIC gene superfamily with potentially 67 subunit-encoding genes.⁶⁷ However, it
6
7 268 appears that several sequences identified are of the same subunit and many of the 21 putative
8
9 269 GluClIs belong to other ion channel families such as AMPA, kainate or NMDA receptors. The
10
11 270 complement and extent of the locust cysLGIC superfamily, therefore, remains to be clarified.
12
13 271 Expansion in the divergent nAChRs mostly accounts for the expanded cockroach cysLGIC
14
15 272 superfamilies. Insects usually possess up to three divergent subunits with *N. vitripennis* being a
16
17 273 notable exception in that it has seven subunits although one of these is a pseudogene.³⁷ *B.*
18
19 274 *germanica* and *P. americana* have the largest sets of divergent nAChR subunits characterized to
20
21 275 date, respectively possessing eight and ten subunits (Figures 3 and 4). RT-PCR analysis has shown
22
23 276 that most of these are transcribed indicating that they may be functional. The functional roles of
24
25 277 divergent nAChRs and the impact of species-specific complements of these nAChR subunits remains
26
27 278 to be elucidated.⁶⁸ For instance, are the two extra nAChR subunits found in *P. americana* increasing
28
29 279 the functional/pharmacological repertoire of receptor function when compared to that of *B.*
30
31 280 *germanica*? It has been shown that the divergent nAChR subunit, $\beta 3$, from *L. migratoria* is part of a
32
33 281 high affinity binding site for imidacloprid⁶⁹ highlighting that these subunits may be involved in
34
35 282 species-specific receptor subtypes targeted by certain insecticides. It would be of interest to see
36
37 283 whether divergent nAChR subunits form part of insecticide targets in cockroaches as well. Also, it
38
39 284 would be informative to determine whether expression of divergent nAChR subunits are altered as
40
41 285 part of an adaptation mechanism for cockroaches to manage exposure to insecticides, such as with
42
43 286 $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits when *P. americana* was exposed to imidacloprid.²²
44
45
46
47
48
49
50

51 287 In addition to possessing distinct groups of divergent nAChR subunits, another difference
52
53 288 observed in the cysLGIC superfamilies of *B. germanica* and *P. americana* was alternative splicing of
54
55 289 *Rdl*. Two putative alternatives for exon 9 of *Rdl* was detected in the genome of *B. germanica* but not
56
57 290 of *P. americana* (Figure 7A). Such alternative splicing of this exon has only been reported once
58
59 291 before for *L. striatellus* where four splice variants affected potency of the agonists GABA and β -
60

alanine.⁵⁹ Perhaps with the extra exon 9 influencing the action of GABA, the functional capabilities of the GABA receptor is broadened in *B. germanica*.

4.2 Cockroach and aphid cysLGIC gene superfamilies share unusual features

Recently, a report concluded that, as with *A. pisum*, *P. americana* lacks an $\alpha 5$ subunit.²⁴ We can confirm here that *P. americana*, as well as *B. germanica*, do indeed possess a putative $\alpha 5$ subunit, which cluster together with *T. castaneum* $\alpha 5$ (Figure 4). However, some cockroach cysLGICs do share features with those particular to *A. pisum*. For instance, the unusual alternative splicing of exons 7 and 8 detected in the *A. pisum* $\alpha 7$ nAChR subunit⁵⁰ has also been observed for *B. germanica* and *P. americana* $\alpha 7$ theoretically giving rise to eight different variants (Figure 6C). Expression of homomeric *P. americana* $\alpha 7$ has been achieved in *Xenopus laevis* oocytes with limited success.²⁴ The splice variant presented in that study corresponds to exon7a+exon8a (Figure 6C). It would be of interest to see whether the expression of other $\alpha 7$ splice variants, or combinations of them, result in more robust expression.

Another unusual feature that the cockroach genome shares with that of *A. pisum* is the presence of a second putative GluCl subunit, designated as GluCl2 (Figure 5).²⁹ It remains to be determined whether GluCl2 functions as a glutamate-gated chloride channel. However, in this regard, it is interesting to note that electrophysiological studies on neurones from *P. americana* demonstrated the co-existence of two pharmacologically distinct glutamate-gated chloride channels,^{19, 70} perhaps as a result of GluCl and GluCl2 acting as independent glutamate receptors. If this is the case, GluCl2, with its low sequence identity to GluCl commonly found in other insects (Table 2), may be a potential target for the design of novel insecticides with higher specificity towards cockroaches and aphids.

Analysis of the *A. pisum* genome revealed the presence of *Rdl2*, *GluCl2* and *pHCl2* genes and the absence of *CG8916*, *LCCH3* and *GRD* orthologues (Figure 5).²⁹ This led to the suggestion that genes arising from duplication of *Rdl*, *GluCl* and *pHCl* in evolutionary ancient insects would

1
2
3 317 eventually evolve into *CG8916*, *LCCH3* and *GRD* in more recent species.²⁹ The cockroach cysLGIC
4
5 318 gene superfamilies may provide further insights into this evolutionary process considering it shares
6
7 319 unusual features with the aphid yet possess orthologues of *8916*, *LCCH3* and *GRD* (Figure 5). Thus, it
8
9 320 is tempting to speculate that, for instance, duplication of *GluCl* produced *GluCl2* providing new
10
11 321 genetic material for mutation and functional drift resulting in either *CG8916*, *LCCH3* or *GRD*.⁷¹ In
12
13 322 cockroaches, *GluCl2* is retained but in more evolved species this gene duplicate is lost. Phylogenetic
14
15 323 analysis shows that cockroach and *A. pisum* *GluCl2* do not clearly cluster with other subunits,
16
17 324 including *CG8916*, *LCCH3* or *GRD* (Figure 5). However, when this analysis is repeated with sequences
18
19 325 consisting only of the N-terminal extracellular domains without the signal peptide, *GluCl2* clusters
20
21 326 with *LCCH3* (Supporting information Figure 1), indicating that duplication of *GluCl* early on in insect
22
23 327 evolution may have given rise to the *LCCH3* gene. In accord with this, evolutionary distance
24
25 328 estimates show that *PameGluCl2* is more closely related to *Tribolium LCCH3* than to *TcasGRD* or
26
27 329 *Tcas8916* (Supporting information Table 3). Analysis of complete cysLGIC gene superfamilies from
28
29 330 other species representing different stages of insect evolution should shed further light on the
30
31 331 evolutionary fate of *Rdl2*, *GluCl2* and *pHCl2* identified in *A. pisum*.

332 4.3 Conclusions

333 The characterization of *B. germanica* and *P. americana* cysLGICs provides further insights into the
334 evolution of this gene superfamily in insects. Also, identification of cockroach cysLGIC subunit genes
335 will provide an important basis for future studies of these ion channels as well as for the rational
336 design of insecticides that control cockroaches, ideally with less effect on non-target organisms.
337 Such studies can include the heterologous expression of certain subunits to determine their
338 functional/pharmacological properties, which will also provide powerful tools enabling screening for
339 improved insecticides that show higher selectivity towards particular cockroach receptors.⁷² In
340 addition, RNA interference, which has been successfully used to study several core nAChR subunits

1
2
3 341 in *P. americana*,⁷³ may also be applied to the newly identified divergent nAChRs or other cysLGIC
4
5 342 subunits to assess their role in neuronal function and response to insecticides.
6
7

8 343 **ACKNOWLEDGEMENTS**
9

10
11 344 This work was supported by INRAE, Inserm, la Région Pays de la Loire and the RFI Objectif Végétal.
12
13

14 345 **CONFLICT OF INTEREST DECLARATION**
15

16
17 346 The authors declare no conflicts of interest.
18
19

20 347 **REFERENCES**
21

- 22
23 348 1 Jones AK, Genomics, cys-loop ligand-gated ion channels and new targets for the control of
24 349 insect pests and vectors. *Curr Opin Insect Sci* **12**:30:1-7 (2018).
25
26 350 2. Jones AK and Sattelle DB, Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Adv*
27 351 *Exp Med Biol* **683**:25-43 (2010).
28
29 352 3. Buckingham SD, Biggin PC, Sattelle BM, Brown LA and Sattelle DB, Insect GABA receptors:
30 353 splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol Pharmacol* **68**:942-951 (2005).
31
32 354 4. Wolstenholme AJ, Glutamate-gated chloride channels. *J Biol Chem* **287**:40232-40238 (2012).
33
34 355 5. Gisselmann G, Pusch H, Hovemann BT and Hatt H, Two cDNAs coding for histamine-gated
35 356 ion channels in *D. melanogaster*. *Nat Neurosci* **5**:11-12 (2002).
36
37 357 6. Zheng Y, Hirschberg B, Yuan J, Wang AP, Hunt DC, Ludmerer SW, Schmatz DM and Cully DF,
38 358 Identification of two novel *Drosophila melanogaster* histamine-gated chloride channel subunits
39 359 expressed in the eye. *J Biol Chem* **277**:2000-2005 (2002).
40
41 360 7. Redhai S, Pilgrim C, Gaspar P, Giesen L, Lopes T, Riabinina O, Grenier T, Milona A, Chanana B,
42 361 Swadling JB, Wang Y-F, Dahalan F, Yuan M, Wilsch-Brauninger M, Lin W-H, Dennison N, Capriotti P,
43 362 Lawniczak MKN, Baines RA, Warnecke T, Windbichler N, Leulier F, Bellono NW and Miguel-Aliaga I,
44 363 An intestinal zinc sensor regulates food intake and developmental growth. *Nature* **580**:263-268
45 364 (2020).
46
47 365 8. Sparks TC, Crossthwaite AJ, Nauen R, Banba S, Cordova D, Earley F, Ebbinghaus-Kintscher U,
48 366 Fujioka S, Hirao A, Karmon D, Kennedy R, Nakao T, Popham HJR, Salgado V, Watson GB, Wedel BJ
49 367 and Wessels FJ, Insecticides, biologics and nematicides: Updates to IRAC's mode of action
50 368 classification - a tool for resistance management. *Pestic Biochem Physiol* **167**:104587 (2020).
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 369 9. Ihara M, Buckingham SD, Matsuda K and Sattelle DB, Modes of Action, Resistance and
4
5 370 Toxicity of Insecticides Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Med Chem* **24**:2925-2934
6
7 371 (2017).
- 8 372 10. Lorsbach BA, Sparks TC, Cicchillo RM, Garizi NV, Hahn DR and Meyer KG, Natural products: a
9
10 373 strategic lead generation approach in crop protection discovery. *Pest Manag Sci* **75**:2301-2309
11
12 374 (2019).
- 13 375 11. Buckingham SD, Ihara M, Sattelle DB and Matsuda K, Mechanisms of Action, Resistance and
14
15 376 Toxicity of Insecticides Targeting GABA Receptors. *Curr Med Chem* **24**:2935-2945 (2017).
16
17 377 doi:10.2174/0929867324666170613075736
- 18 378 12. Li S, Zhu S, Jia Q, Yuan D, Ren C, Li K, Liu S, Cui Y, Zhao H, Cao Y, Fang G, Li D, Zhao X, Zhang J,
19
20 379 Yue Q, Fan Y, Yu X, Feng Q and Zhan S, The genomic and functional landscapes of developmental
21
22 380 plasticity in the American cockroach. *Nat Commun* **9**:1008 (2018).
- 23 381 13. Zhu F, Lavine L, O'Neal S, Lavine M, Foss C and Walsh D, Insecticide Resistance and
24
25 382 Management Strategies in Urban Ecosystems. *Insects* **7**(1) (2016).
- 26 383 14. Wang C, Scharf ME and Bennett GW, Genetic basis for resistance to gel baits, fipronil, and
27
28 384 sugar-based attractants in German cockroaches (Dictyoptera: blattellidae). *J Econ Entomol* **99**:1761-
29
30 385 1767 (2006).
- 31 386 15. Ko AE, Bieman DN, Schal C and Silverman J, Insecticide resistance and diminished secondary
32
33 387 kill performance of bait formulations against German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Pest*
34
35 388 *Manag Sci* **72**:1778-1784 (2016).
- 36 389 16. Hu IH, Chen SM, Lee CY and Neoh KB, Insecticide Resistance, and Its Effects on Bait
37
38 390 Performance in Field-Collected German Cockroaches (Blattodea: Ectobiidae) From Taiwan. *J Econ*
39
40 391 *Entomol* **113**:1389-1398 (2020).
- 41 392 17. Peterson RT, Nass R, Boyd WA, Freedman JH, Dong K and Narahashi T, Use of non-
42
43 393 mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology* **29**:546-555 (2008).
- 44 394 18. Nomura K, Kawase A, Ozoe Y and Banba S, Further characterization of distinct high-affinity
45
46 395 binding sites for dinotefuran in the abdominal nerve cord of the American cockroach *Periplaneta*
47
48 396 *americana* (Blattodea). *Pestic Biochem Physiol* **165**:104554 (2020).
- 49 397 19. Zhao X, Salgado VL, Yeh JZ and Narahashi T, Kinetic and pharmacological characterization of
50
51 398 desensitizing and non-desensitizing glutamate-gated chloride channels in cockroach neurons.
52
53 399 *Neurotoxicology* **25**:967-980 (2004).
- 54 400 20. Taillebois E, Cartereau A, Jones AK and Thany SH, Neonicotinoid insecticides mode of action
55
56 401 on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pestic Biochem Physiol* **151**:59-66
57
58 402 (2018).
59
60

- 1
2
3 403 21. Onozaki Y, Horikoshi R, Ohno I, Kitsuda S, Durkin KA, Suzuki T, Asahara C, Hiroki N,
4 404 Komabashiri R, Shimizu R, Furutani S, Ihara M, Matsuda K, Mitomi M, Kagabu S, Uomoto K and
5 405 Tomizawa M, Flupyrimin: A Novel Insecticide Acting at the Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Agric*
6 406 *Food Chem* **65**:7865-7873 (2017).
7
8 407 22. Benzidane Y, Goven D, Abd-Ella AA, Deshayes C, Lapied B and Raymond V, Subchronic
9 408 exposure to sublethal dose of imidacloprid changes electrophysiological properties and expression
10 409 pattern of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in insect neurosecretory cells. *Neurotoxicology*
11 410 **62**:239-247 (2017).
12
13 411 23. Salgado VL, Antagonist pharmacology of desensitizing and non-desensitizing nicotinic
14 412 acetylcholine receptors in cockroach neurons. *Neurotoxicology* **56**:188-195 (2016).
15
16 413 24. Cartereau A, Taillebois E, Selvam B, Martin C, Graton J, Le Questel J-V and Thany SH, Cloning
17 414 and Expression of Cockroach $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit. *Front Physiol* **11**:418
18 415 (2020).
19
20 416 25. Taillebois E and Thany SH, Characterization of nicotine acetylcholine receptor subunits in the
21 417 cockroach *Periplaneta americana* mushroom bodies reveals a strong expression of $\beta 1$ subunit:
22 418 involvement in nicotine-induced currents. *Arch Insect Biochem Physiol* **93**:40-54 (2016).
23
24 419 26. Kaku K and Matsumura F, Identification of the site of mutation within the M2 region of the
25 420 GABA receptor of the cyclodiene-resistant German cockroach. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol*
26 421 *Toxicol Endocrinol* **108**:367-76 (1994).
27
28 422 27. Harrison MC, Jongepier E, Robertson HM, Arning N, Bitard-Feildel T, Chao H, Childers CP,
29 423 Dinh H, Doddapaneni H, Dugan S, Gowin J, Greiner C, Han Y, Hu H, Hughes DST, Huylmans A-K,
30 424 Kemena C, Kremer LPM, L Lee S, Lopez-Ezquerria A, Mallet L, Monroy-Kuhn JM, Moser A, Murali SC,
31 425 Muzny DM, Otani S, Piulachs M-D, Poelchau M, Qu J, Schaub F, Wada-Katsumata A, Worley KC, Xie
32 426 Q, Ylla G, Poulsen M, Gibbs RA, Schal C, Richards S, Belles X, Korb J and Bornberg-Bauer E,
33 427 Hemimetabolous genomes reveal molecular basis of termite eusociality. *Nat Ecol Evol* **2**:557-566
34 428 (2018).
35
36 429 28. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ, Basic local alignment search tool. *J*
37 430 *Mol Biol* **215**:403-410 (1990).
38
39 431 29. Del Villar SG and Jones AK, Cloning and functional characterisation of the duplicated RDL
40 432 subunits from the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Int J Mol Sci* **19**(8) (2018).
41
42 433 30. Jones AK and Sattelle DB, The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red
43 434 flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics* **8**:327 (2007).
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 435 31. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG, The CLUSTAL_X windows
4 436 interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic*
5 437 *Acids Res* **25**:4876-4882 (1997).
- 8 438 32. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G and Brunak S, Improved prediction of signal peptides:
9 439 SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**:783-795 (2004).
- 11 440 33. Hulo N, Bairoch A, Bulliard V, Cerutti L, De Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Pagni M and
12 441 Sigrist CJ, The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue):D227-230 (2006).
- 15 442 34. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K, MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics
16 443 Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* **35**:1547-1549 (2018).
- 18 444 35. Dent JA, Evidence for a diverse Cys-loop ligand-gated ion channel superfamily in early
19 445 bilateria. *J Mol Evol* **62**:523-535 (2006).
- 21 446 36. Jones AK and Sattelle DB, The cys-loop ligand-gated ion channel superfamily of the
22 447 honeybee, *Apis mellifera*. *Invert Neurosci* **6**:123-132 (2006).
- 25 448 37. Jones AK, Bera AN, Lees K and Sattelle DB, The cys-loop ligand-gated ion channel gene
26 449 superfamily of the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*. *Heredity (Edinb)* **104**:247-259 (2010).
- 28 450 38. Matthews BJ, Dudchenko O, Kingan SB, Koren S, Antoshechkin I, Crawford JE, Glassford WJ,
29 451 Herre M, Redmond SN, Rose NH, Weedall GD, Wu Y, Batra SS, Brito-Sierra CA, Buckingham SD,
30 452 Campbell CL, Chan S, Cox E, Evans BR, Fansiri T, Filipović I, Fontaine A, Gloria-Soria A, Hall R, Joardar
31 453 VS, Jones AK, Kay RGG, Kodali VK, Lee J, Lycett GJ, Mitchell SN, Muehling J, Murphy MR, Omer AD,
32 454 Partridge FA, Peluso P, Aiden AP, Ramasamy V, Rašić G, Roy S, Saavedra-Rodriguez K, Sharan S,
33 455 Sharma A, Smith ML, Turner J, Weakley AM, Zhao Z, Akbari OS, Black WC 4th, Cao H, Darby AC, Hill
34 456 CA, Johnston JS, Murphy TD, Raikhel AS, Sattelle DB, Sharakhov IV, White BJ, Zhao L, Aiden EL, Mann
35 457 RS, Lambrechts L, Powell JR, Sharakhova MV, Tu Z, Robertson HM, McBride CS, Hastie AR, Korlach J,
36 458 Neafsey DE, Phillippy AM and Vosshall LB, Improved reference genome of *Aedes aegypti* informs
37 459 arbovirus vector control. *Nature* **563**:501-507 (2018).
- 45 460 39. Rinkevich FD and Bourgeois L, In silico identification and assessment of insecticide target
46 461 sites in the genome of the small hive beetle, *Aethina tumida*. *BMC Genomics* **21**:154 (2020).
- 48 462 40. Sine SM and Engel AG, Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*
49 463 **440**:448-455 (2006).
- 51 464 41. Corringer PJ, Le Novère N and Changeux JP, Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu*
52 465 *Rev Pharmacol Toxicol* **40**:431-458 (2000).
- 55 466 42. Gehle VM, Walcott EC, Nishizaki T and Sumikawa K, N-glycosylation at the conserved sites
56 467 ensures the expression of properly folded functional ACh receptors. *Brain Res Mol Brain Res* **45**:219-
57 468 229 (1997).
- 59
60

- 1
2
3 469 43. Nishizaki T, N-glycosylation sites on the nicotinic ACh receptor subunits regulate receptor
4 470 channel desensitization and conductance. *Brain Res Mol Brain Res* **114**:172-176 (2003).
- 5
6 471 44. Hopfield JF, Tank DW, Greengard P and Huganir RL, Functional modulation of the nicotinic
7 472 acetylcholine receptor by tyrosine phosphorylation. *Nature* **336**:677-680 (1988).
- 8
9 473 45. Borges LS and Ferns M, Agrin-induced phosphorylation of the acetylcholine receptor
10 474 regulates cytoskeletal anchoring and clustering. *J Cell Biol* **153**:1-12 (2001).
- 11
12 475 46. Talwar S and Lynch JW, Phosphorylation mediated structural and functional changes in
13 476 pentameric ligand-gated ion channels: implications for drug discovery. *Int J Biochem Cell Biol* **53**:218-
14 477 223 (2014).
- 15
16 478 47. Sattelle DB, Jones AK, Sattelle BM, Matsuda K, Reenan R and Biggin PC, Edit, cut and paste in
17 479 the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* **27**:366-376
18 480 (2005).
- 19
20 481 48. Jones AK, Grauso M and Sattelle DB, The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the
21 482 malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* **85**:176-187 (2005).
22 483 doi:10.1016/j.ygeno.2004.09.001
- 23
24 484 49. Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH, Gauthier M and Sattelle DB, The nicotinic
25 485 acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res* **16**:1422-1430
26 486 (2006).
- 27
28 487 50. Dale RP, Jones AK, Tamborindéguy C, Davies TGE, Amey JS, Williamson S, Wolstenholme A,
29 488 Field LM, Williamson MS, Walsh TK and Sattelle DB, Identification of ion channel genes in the
30 489 *Acyrtosiphon pisum* genome. *Insect Mol Biol* **2**:141-153 (2010).
- 31
32 490 51. Shao YM, Dong K and Zhang CX, The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the
33 491 silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* **8**:324 (2007).
- 34
35 492 52. Shimomura M, Yokota M, Matsuda K, Sattelle DB and Komai K, Roles of loop C and the loop
36 493 B-C interval of the nicotinic receptor alpha subunit in its selective interactions with imidacloprid in
37 494 insects. *Neurosci Lett* **363**:195-198 (2004).
- 38
39 495 53. Galzi JL, Bertrand D, Devillers-Thiéry A, Revah F, Bertrand S and Changeux JP, Functional
40 496 significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the alpha 7 neuronal nicotinic
41 497 receptor site investigated by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* **294**:198-202 (1991).
- 42
43 498 54. Jensen ML, Schousboe A and Ahring PK, Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-
44 499 gated ion channels. *J Neurochem* **92**:217-225 (2005).
- 45
46 500 55. Lansdell SJ and Millar NS, Cloning and heterologous expression of Dalpha4, a *Drosophila*
47 501 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing
48 502 the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacology* **39**:2604-2614 (2000).
- 59
60

- 1
2
3 503 56. Henry C, Cens T, Charnet P, Cohen-Solal C, Collet C, van-Dijk J, Guiramand J, de Jésus-Ferreira
4 504 M-C, Menard C, Mokrane N, Roussel J, Thibault J-B, Vignes M and Rousset M, Heterogeneous
5 505 expression of GABA receptor-like subunits LCCH3 and GRD reveals functional diversity of GABA
6 506 receptors in the honeybee *Apis mellifera*. *Br J Pharmacol* May 2020;doi:10.1111/bph.15135
7
8 507 57. Gisselmann G, Plonka J, Pusch H and Hatt H, *Drosophila melanogaster* GRD and LCCH3
9 508 subunits form heteromultimeric GABA-gated cation channels. *Br J Pharmacol* **142**:409-413 (2004).
10
11 509 58. ffrench-Constant RH and Rocheleau TA, *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor gene
12 510 Rdl shows extensive alternative splicing. *J Neurochem* **60**:2323-2326 (1993).
13
14 511 59. Jiang J, Huang LX, Chen F, Sheng C-W, Huang Q-T, Han Z-J and Zhao C-Q, Novel alternative
15 512 splicing of GABA receptor RDL exon 9 from *Laodelphax striatellus* modulates agonist potency. *Insect*
16 513 *Sci* Apr 2020;doi:10.1111/1744-7917.12789
17
18 514 60. Taylor-Wells J, Hawkins J, Colombo C, Bermudez I and Jones AK, Cloning and functional
19 515 expression of intracellular loop variants of the honey bee (*Apis mellifera*) RDL GABA receptor.
20 516 *Neurotoxicology* **60**:207-213 (2017).
21
22 517 61. Jiang F, Zhang Y, Sun H, Meng X, Bao H, Fang J and Liu Z, Identification of polymorphisms in
23 518 *Cyrtorhinus lividipennis* RDL subunit contributing to fipronil sensitivity. *Pestic Biochem Physiol*
24 519 **117**:62-67 (2015).
25
26 520 62. Akashi HD, Chen PJ, Akiyama T, Terai Y, Wakakuwa M, Takayama Y, Tominaga M and
27 521 Arikawa K, Physiological responses of ionotropic histamine receptors, P_xHCLA and P_xHCLB, to
28 522 neurotransmitter candidates in a butterfly, *Papilio xuthus*. *J Exp Biol* **221**(Pt 21) (2018)
29
30 523 63. Wang JD, Chen LF, Lin DJ, Zhang J-S, Zhao J-H, Xiao D, Wang R, Wang R and Gao S-J,
31 524 Molecular cloning, characterization and functional analysis of GluCl from the oriental armyworm,
32 525 *Mythimna separata* Walker. *Pestic Biochem Physiol* **156**:56-62 (2019).
33 526 doi:10.1016/j.pestbp.2019.02.004
34
35 527 64. Schnizler K, Saeger B, Pfeffer C, Gerbaulet A, Ebbinghaus-Kintscher U, Methfessel C, Franken
36 528 E-M, Raming K, Wetzels CH, Saras A, Pusch H, Hatt H and Gisselmann G, A novel chloride channel in
37 529 *Drosophila melanogaster* is inhibited by protons. *J Biol Chem* **280**:16254-16262 (2005).
38
39 530 65. Frenkel L, Muraro NI, Beltrán González AN, Marcora MS, Bernabó G, Hermann-Luibl C,
40 531 Romero JI, Helfrich-Förster C, Castaño EM, Marino-Busjle C, Calvo DJ and Ceriani MF, Organization of
41 532 Circadian Behavior Relies on Glycinergic Transmission. *Cell Rep* **19**:72-85 (2017).
42
43 533 66. Littleton JT and Ganetzky B, Ion channels and synaptic organization: analysis of the
44 534 *Drosophila* genome. *Neuron* **26**:35-43 (2000).
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 535 67. Wang X, Meng X, Liu C, Gao H, Zhang Y and Liu Z, Cys-loop ligand-gated ion channel gene
4 536 discovery in the *Locusta migratoria manilensis* through the neuron transcriptome. *Gene* **561**:276-282
5 537 (2015).
6
7
8 538 68. Jones AK, Buckingham SD, Brown LA and Sattelle DB, Alternative splicing of the *Anopheles*
9 539 *gambiae* nicotinic acetylcholine receptor, Agamalphabeta9, generates both alpha and beta subunits.
10 540 *Invert Neurosci* **9**:77-84 (2009).
11
12
13 541 69. Bao H, Liu Y, Zhang Y and Liu Z, Two distinctive β subunits are separately involved in two
14 542 binding sites of imidacloprid with different affinities in *Locusta migratoria manilensis*. *Pestic Biochem*
15 543 *Physiol* **140**:36-41 (2017).
16
17
18 544 70. Raymond V, Sattelle DB and Lapied B, Co-existence in DUM neurones of two GluCl channels
19 545 that differ in their picrotoxin sensitivity. *Neuroreport* **11**:2695-2701 (2000).
20
21
22 546 71. Magadam S, Banerjee U, Murugan P, Gangapur D and Ravikesavan R, Gene duplication as a
23 547 major force in evolution. *J Genet* **92**:155-161 (2013).
24
25 548 72. Buckingham SD, Pym L and Sattelle DB, Oocytes as an expression system for studying
26 549 receptor/channel targets of drugs and pesticides. *Methods Mol Biol* **322**:331-345 (2006).
27
28 550 73. Sun H, Liu Y, Li J, Cang X, Bao H and Liu Z, The potential subunits involved in two subtypes of
29 551 α -Bgt-resistant nAChRs in cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons. *Insect Biochem Mol*
30 552 *Biol* **81**:32-40 (2017).
31
32
33
34 553
35
36
37 554
38
39
40 555
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

TABLES

Table 1. Percentage identity/similarity between *P. americana* and *T. castaneum* nAChR subunit protein sequences.

Subunit	Tcas α 1	Tcas α 2	Tcas α 3	Tcas α 4	Tcas α 5	Tcas α 6	Tcas α 7	Tcas α 8	Tcas β 1	Tcas α 9	Tcas α 10	Tcas α 11
Pame α 1	75/83	52/67	55/68	52/63	27/44	33/48	33/50	53/66	38/55	15/32	18/35	53/68
Pame α 2	52/67	79/86	50/66	47/62	26/46	34/52	35/51	49/65	37/54	14/32	19/36	50/66
Pame α 3	54/67	49/64	84/90	67/76	27/44	33/49	32/48	53/65	39/54	14/31	19/34	54/65
Pame α 4	51/62	46/61	67/76	85/89	26/43	33/49	32/49	51/65	38/54	14/31	18/33	52/66
Pame α 5	29/49	27/48	28/46	27/46	65/75	34/54	31/50	28/48	30/50	16/34	22/42	28/50
Pame α 6	32/49	33/50	32/48	32/40	33/52	82/90	65/76	33/50	32/52	16/35	22/41	33/52
Pame α 7	34/50	35/51	34/50	33/49	31/51	67/78	77/83	34/50	32/51	15/32	21/40	35/52
Pame α 8	54/69	50/67	56/68	54/67	27/45	34/52	34/51	70/79	38/56	14/34	19/36	72/81
Pame β 1	38/54	38/54	39/55	38/54	27/45	32/52	32/51	38/54	84/88	14/32	19/36	39/56
Pame α 9	20/36	19/36	20/36	20/35	21/42	22/41	20/38	20/38	20/38	20/39	50/69	20/39
Pame β 2	11/25	11/24	11/25	11/24	10/26	10/26	10/25	12/27	10/25	13/28	16/31	12/26
Pame β 3	13/29	13/29	12/28	13/28	16/32	16/32	13/30	13/31	13/30	23/45	18/37	13/31
Pame β 4	13/30	13/30	14/29	13/28	16/32	16/32	14/30	14/31	13/28	23/45	18/37	14/31
Pame β 5	13/30	14/30	14/29	14/30	15/34	14/31	14/29	14/32	13/30	24/49	20/37	14/32
Pame β 6	13/29	14/30	14/28	14/28	16/34	14/31	13/30	15/33	14/31	27/51	20/38	14/32
Pame β 7	13/29	12/26	13/27	12/28	17/34	15/29	14/29	14/32	13/29	24/44	20/38	14/31
Pame β 8	12/29	12/29	12/27	12/27	13/32	13/30	13/27	12/32	13/30	20/46	19/36	12/31
Pame β 9	14/29	12/28	13/28	12/27	18/35	14/30	13/28	14/31	14/29	25/44	17/39	14/31
Pame β 10	14/30	14/31	14/30	14/30	19/37	18/34	17/33	16/36	15/32	28/50	18/40	16/35

Proposed orthologues are shown in bold.

Table 2. Percentage identity/similarity between *P. americana* and *T. castaneum* non-nAChR subunit protein sequences.

Subunit	TcasRDL	TcasGRD	TcasLCCH3	Tcas8916	TcasGluCl	TcasHisCl1	TcasHisCl2	TcaspHCl	Tcas12344	Tcas6927	Tcas7589	Tcas11340
PameRDL	83/86	28/42	32/50	25/41	28/42	23/40	24/39	19/38	23/40	18/33	17/33	17/34
PameGRD	29/42	67/74	28/44	37/51	23/37	21/36	20/35	17/31	19/33	18/30	16/29	15/31
PameLCCH3	32/49	26/42	73/83	26/42	25/42	23/39	24/38	17/35	21/38	18/37	18/35	17/35
Pame8916	24/37	36/49	25/39	64/75	20/34	19/31	19/33	16/29	17/30	16/29	15/29	15/30
Pame8916_2	21/35	25/35	20/33	24/37	19/33	16/30	16/27	15/28	15/28	14/26	13/26	14/28
PameGluCl	28/43	22/38	24/43	21/35	83/90	27/44	26/44	26/46	21/39	21/38	20/35	21/39
PameGluCl2	25/41	21/38	26/42	20/36	33/50	27/45	28/46	26/44	22/39	22/39	21/36	22/40
PameHisCl1	22/39	20/36	23/40	19/33	28/45	81/87	53/67	20/41	28/49	18/34	17/34	19/38
PameHisCl2	23/38	21/37	24/39	19/33	27/46	54/69	79/85	20/38	28/50	17/34	17/34	18/38
PamepHCl	19/37	16/30	18/35	16/30	26/46	21/39	20/39	82/87	18/36	20/35	18/32	20/37
Pame12344	22/39	20/35	22/38	18/33	22/40	27/49	28/47	20/38	56/74	19/36	18/34	20/38
PameCLGC1	20/37	18/31	20/38	16/32	23/40	19/35	20/36	20/36	19/35	34/51	34/51	30/51
PameCLGC2	19/37	18/33	20/38	17/33	19/38	15/34	17/35	20/36	16/35	34/53	32/50	29/48

Proposed orthologues are shown in bold.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Protein sequence alignment of *P. americana* nAChR subunits. D α 1 of *D. melanogaster* (Accession Number CAA30172) is included for comparison. For further information about the cockroach sequences used, see Supporting information Table 1. N-terminal signal leader peptides are highlighted by dark grey shading with white text and putative N-glycosylation sites in the N-terminal extracellular domain are shown in light grey shading with white text. Loops implicated in ligand binding (LpA-F) as well as transmembrane regions (TM) are indicated. The two cysteines forming the cys-loop as well as the two adjacent cysteines defining α subunits in loop C are highlighted in black shading. Casein kinase II, protein kinase C, tyrosine kinase and cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites in the intracellular loop between TM3 and TM4 are highlighted by grey shading.

Figure 2. Protein sequence alignment of *P. americana* cysLGIC subunits other than nAChRs. RDL of *D. melanogaster* (Accession Number AAA28556) is included for comparison. For further information about the cockroach sequences used, see Supporting information Table 1. N-terminal signal leader peptides are highlighted by dark grey shading with white text and putative N-glycosylation sites in the N-terminal extracellular domain are shown in light grey shading with white text. Loops implicated in ligand binding (LpA-F) as well as transmembrane regions (TM) are indicated. The two cysteines forming the cys-loop are highlighted in black shading. Casein kinase II, protein kinase C and cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites in the intracellular loop between TM3 and TM4 are highlighted by dark grey shading.

Figure 3. Tree showing relationships of the complete complement of *B. germanica* and *P. americana* cysLGIC subunit protein sequences. *P. americana* subunits are highlighted in bold. Numbers next to

1
2
3 branches signify bootstrapping 1000 times represented as a percentage of trees in which the
4 associated taxa clustered together. GLIC (Accession number 2XQ3_A), from *Gloeobacter violaceus*, a
5 bacterial ancestor of cysLGICs, was used as an outgroup. The tree is drawn to scale and the scale bar
6 represents substitutions per site.
7
8
9
10

11
12
13
14
15 **Figure 4.** Tree showing relationships of *B. germanica*, *P. americana*, *A. pisum* and *T. castaneum*
16 nAChR subunit protein sequences. Cockroach subunits are highlighted in bold. Numbers next to
17 branches signify bootstrapping 1000 times represented as a percentage of trees in which the
18 associated taxa clustered together. GLIC (Accession number 2XQ3_A), from *Gloeobacter violaceus*, a
19 bacterial ancestor of cysLGICs, was used as an outgroup. The tree is drawn to scale and the scale bar
20 represents substitutions per site.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **Figure 5.** Tree showing relationships of *B. germanica*, *P. americana*, *A. pisum* and *T. castaneum* non-
34 AChR subunit protein sequences. Cockroach subunits are highlighted in bold. Numbers next to
35 branches signify bootstrapping 1000 times represented as a percentage of trees in which the
36 associated taxa clustered together. GLIC (Accession number 2XQ3_A), from *Gloeobacter violaceus*, a
37 bacterial ancestor of cysLGICs, was used as an outgroup. The tree is drawn to scale and the scale bar
38 represents substitutions per site.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 **Figure 6.** Alternative splicing of exons and RNA A-to-I editing in *B. germanica* and *P. americana*
51 nicotinic acetylcholine receptor subunits. Equivalent alternate exons of *P. americana* and *T.*
52 *castaneum* cys-loop LGIC subunits are aligned. Unless shown, *B. germanica* exon sequences are
53 identical to those of *P. americana*. (A) Exon 4 splice variants in Pame α 4 and Tcas α 4. The cysteine
54 residues forming the cys-loop are marked by asterisks. (B) Splice variants of exons 3 and 8 in
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Pame α 6 and Tcas α 6. The second transmembrane region (TM2) is indicated. (C) Splice variants of
4
5 exons 7 and 8 in Bger α 7, Pame α 7 and *A. pisum* α 7. (D) RNA A-to-I editing of Pame α 6 detected by
6
7 RT-PCR. Genomic DNA (gDNA, sequence available at NCBI) as well as cDNA sequences encoding for
8
9 LoopE are shown. Residues altered by putative A-to-I editing are highlighted in bold. The amino acid
10
11 LoopE are shown. Residues altered by putative A-to-I editing are highlighted in bold. The amino acid
12
13 residue affected by RNA editing in *T. castaneum* α 6 is also shown. Throughout the figure, cockroach
14
15 residues that differ from those of the orthologous *T. castaneum* or *A. pisum* exon are highlighted in
16
17 bold and loops B to E, which contribute to ligand binding, are indicated.

18
19
20
21
22
23 **Figure 7.** Alternative splicing of exons in *B. germanica* and *P. americana* RDL and GluCl subunits. (A)
24
25 Splice variants of exons 3 and 6 of *B. germanica*, *P. americana* and *T. castaneum* RDLs as well as
26
27 variants of exon 9 of *B. germanica* and *Laodelphax striatellus* RDLs. The fourth transmembrane
28
29 region (TM4) is indicated and '>' denotes a stop codon. (B) Variants of *P. americana* and *C.*
30
31 *lividipennis* RDLs with intracellular loops between TM3 and TM4 of varying lengths arising from
32
33 differential use of splice sites. Potential protein kinase C phosphorylation sites are highlighted in grey
34
35 shading. (C) Splice variants of exon 3 of *B. germanica*, *P. americana* and *T. castaneum* GluCls.
36
37 Throughout the figure, cockroach residues that differ from those of the orthologous *T. castaneum* or
38
39 *L. striatellus* exon are highlighted in bold and loops C to F, which contribute to ligand binding, are
40
41 indicated.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Figure 1. Protein sequence alignment of *P. americana* nAChR subunits. Da1 of *D. melanogaster* (Accession Number CAA30172) is included for comparison. For further information about the cockroach sequences used, see Supporting information Table 1. N-terminal signal leader peptides are highlighted by dark grey shading with white text and putative N-glycosylation sites in the N-terminal extracellular domain are shown in light grey shading with white text. Loops implicated in ligand binding (LpA-F) as well as transmembrane regions (TM) are indicated. The two cysteines forming the cys-loop as well as the two adjacent cysteines defining a subunits in loop C are highlighted in black shading. Casein kinase II, protein kinase C, tyrosine kinase and cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites in the intracellular loop between TM3 and TM4 are highlighted by grey shading.

285x189mm (150 x 150 DPI)

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



Figure 2. Protein sequence alignment of *P. americana* cysLIGC subunits other than nAChRs. RDL of *D. melanogaster* (Accession Number AAA28556) is included for comparison. For further information about the cockroach sequences used, see Supporting information Table 1. N-terminal signal leader peptides are highlighted by dark grey shading with white text and putative N-glycosylation sites in the N-terminal extracellular domain are shown in light grey shading with white text. Loops implicated in ligand binding (LpA-F) as well as transmembrane regions (TM) are indicated. The two cysteines forming the cys-loop are highlighted in black shading. Casein kinase II, protein kinase C and cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites in the intracellular loop between TM3 and TM4 are highlighted by dark grey shading.

338x176mm (150 x 150 DPI)

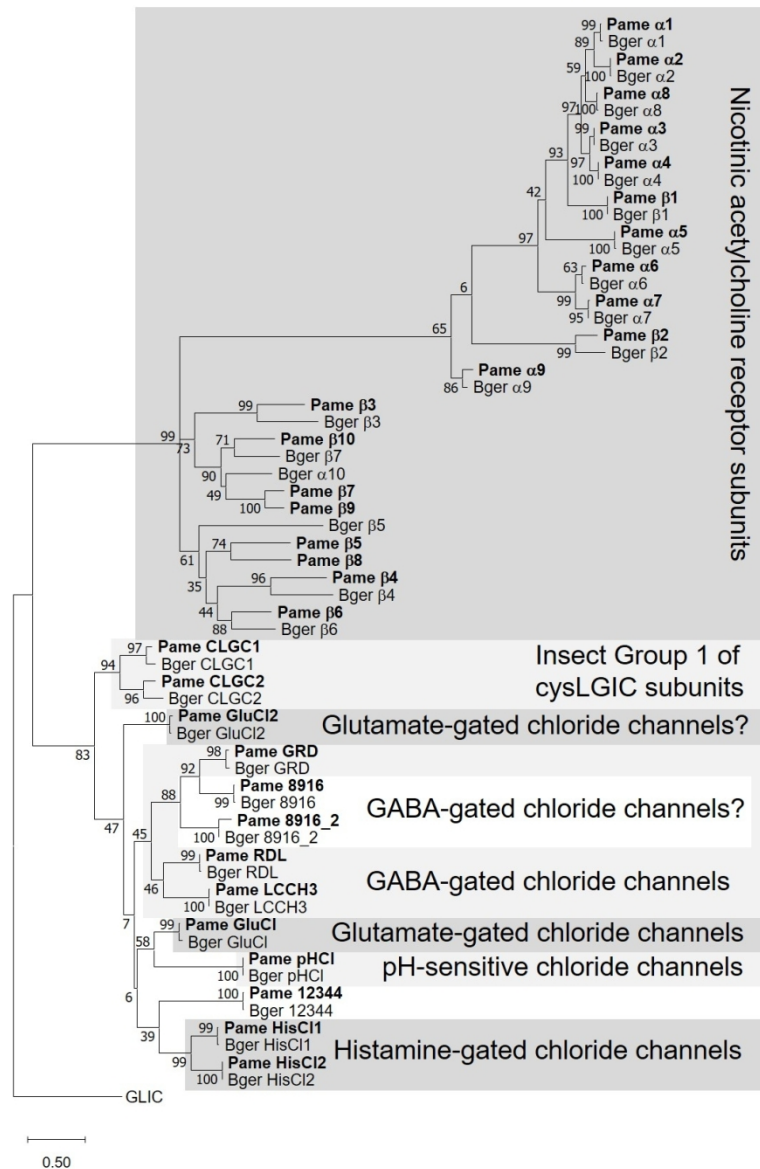


Figure 3. Tree showing relationships of the complete complement of *B. germanica* and *P. americana* cysLGIC subunit protein sequences. *P. americana* subunits are highlighted in bold. Numbers next to branches signify bootstrapping 1000 times represented as a percentage of trees in which the associated taxa clustered together. GLIC (Accession number 2XQ3_A), from *Gloeobacter violaceus*, a bacterial ancestor of cysLGICs, was used as an outgroup. The tree is drawn to scale and the scale bar represents substitutions per site.

187x285mm (150 x 150 DPI)

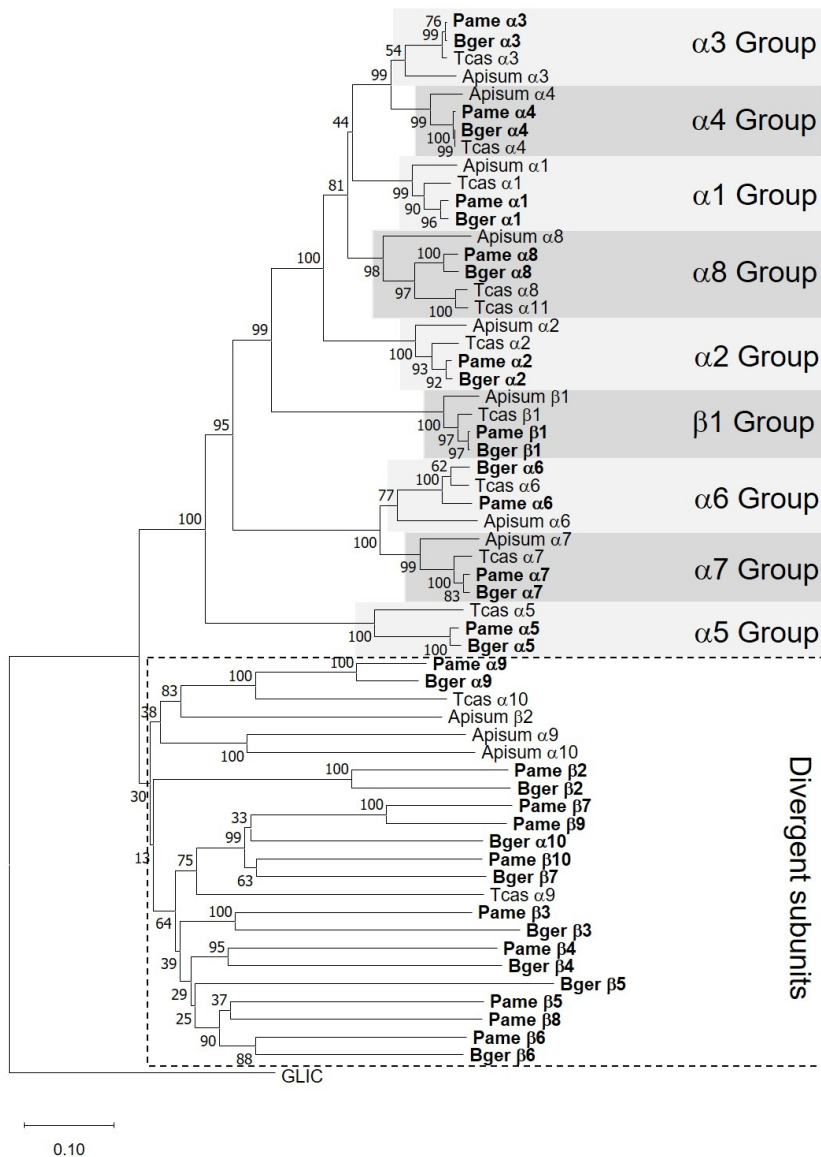


Figure 4. Tree showing relationships of *B. germanica*, *P. americana*, *A. pisum* and *T. castaneum* nAChR subunit protein sequences. Cockroach subunits are highlighted in bold. Numbers next to branches signify bootstrapping 1000 times represented as a percentage of trees in which the associated taxa clustered together. GLIC (Accession number 2XQ3_A), from *Gloeobacter violaceus*, a bacterial ancestor of cysLGICs, was used as an outgroup. The tree is drawn to scale and the scale bar represents substitutions per site.

184x257mm (150 x 150 DPI)

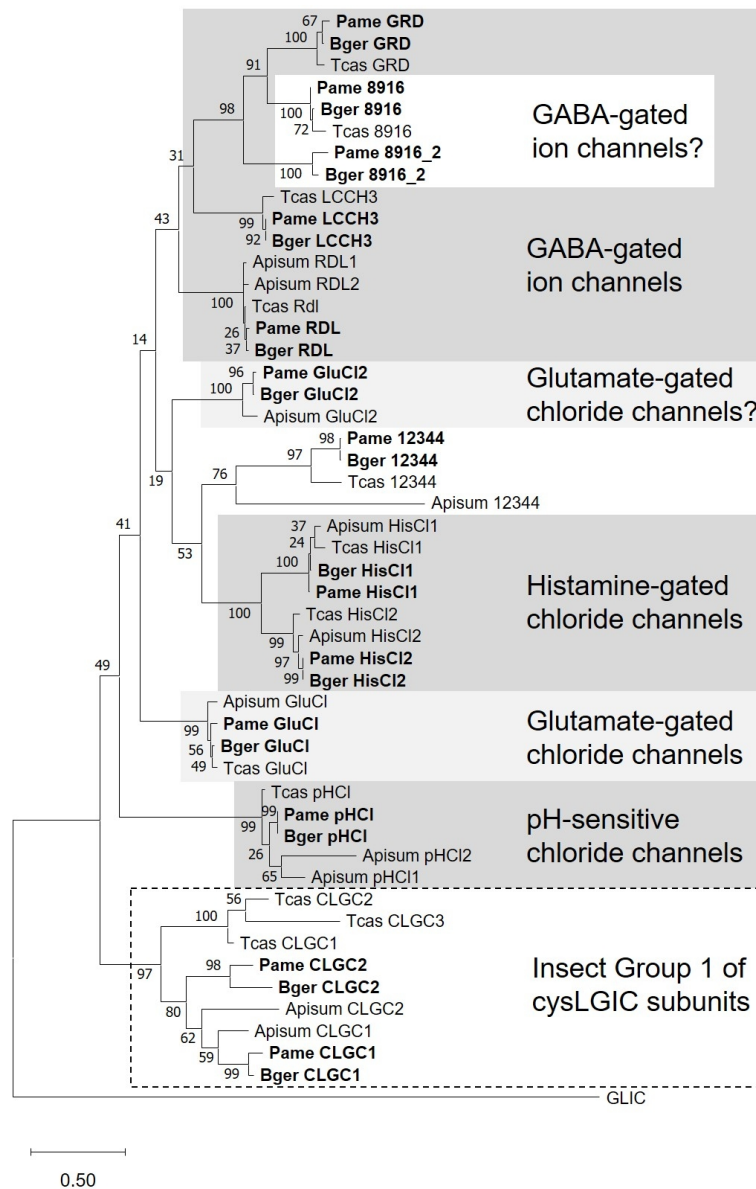


Figure 5. Tree showing relationships of *B. germanica*, *P. americana*, *A. pisum* and *T. castaneum* non-AChR subunit protein sequences. Cockroach subunits are highlighted in bold. Numbers next to branches signify bootstrapping 1000 times represented as a percentage of trees in which the associated taxa clustered together. GLIC (Accession number 2XQ3_A), from *Gloeobacter violaceus*, a bacterial ancestor of cysLGICs, was used as an outgroup. The tree is drawn to scale and the scale bar represents substitutions per site.

182x273mm (150 x 150 DPI)

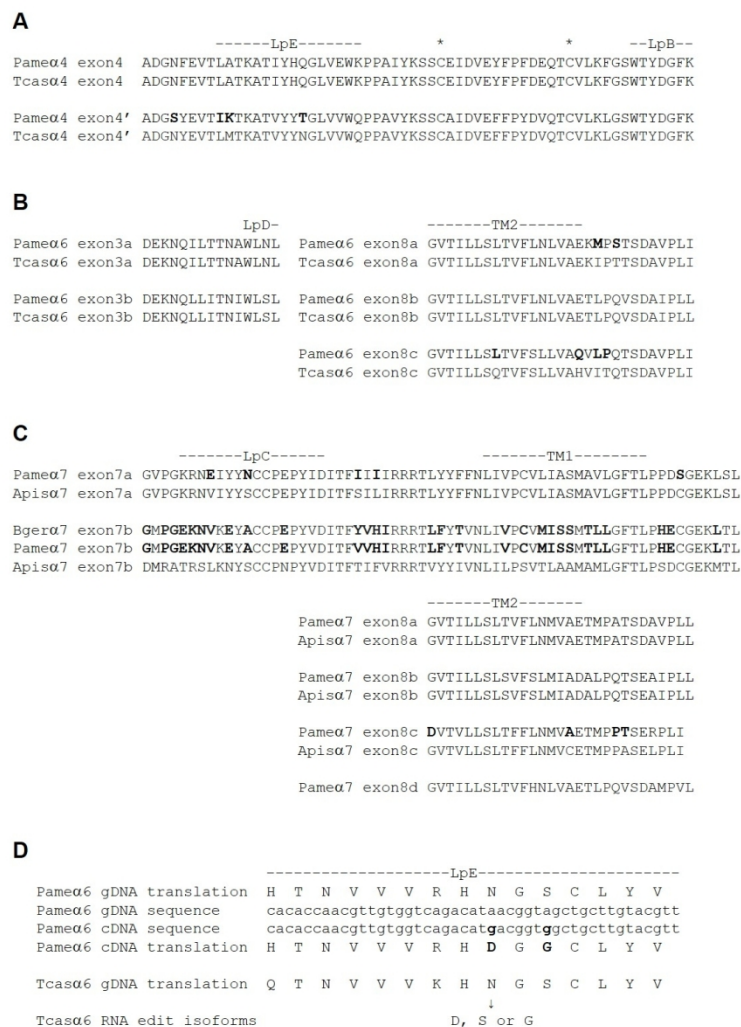


Figure 6. Alternative splicing of exons and RNA A-to-I editing in *B. germanica* and *P. americana* nicotinic acetylcholine receptor subunits. Equivalent alternate exons of *P. americana* and *T. castaneum* cys-loop LGIC subunits are aligned. Unless shown, *B. germanica* exon sequences are identical to those of *P. americana*. (A) Exon 4 splice variants in Pamea4 and Tcasa4. The cysteine residues forming the cys-loop are marked by asterisks. (B) Splice variants of exons 3 and 8 in Pamea6 and Tcasa6. The second transmembrane region (TM2) is indicated. (C) Splice variants of exons 7 and 8 in Bgera7, Pamea7 and *A. pisum* a7. (D) RNA A-to-I editing of Pamea6 detected by RT-PCR. Genomic DNA (gDNA, sequence available at NCBI) as well as cDNA sequences encoding for LoopE are shown. Residues altered by putative A-to-I editing are highlighted in bold. The amino acid residue affected by RNA editing in *T. castaneum* a6 is also shown. Throughout the figure, cockroach residues that differ from those of the orthologous *T. castaneum* or *A. pisum* exon are highlighted in bold and loops B to E, which contribute to ligand binding, are indicated.

254x263mm (150 x 150 DPI)

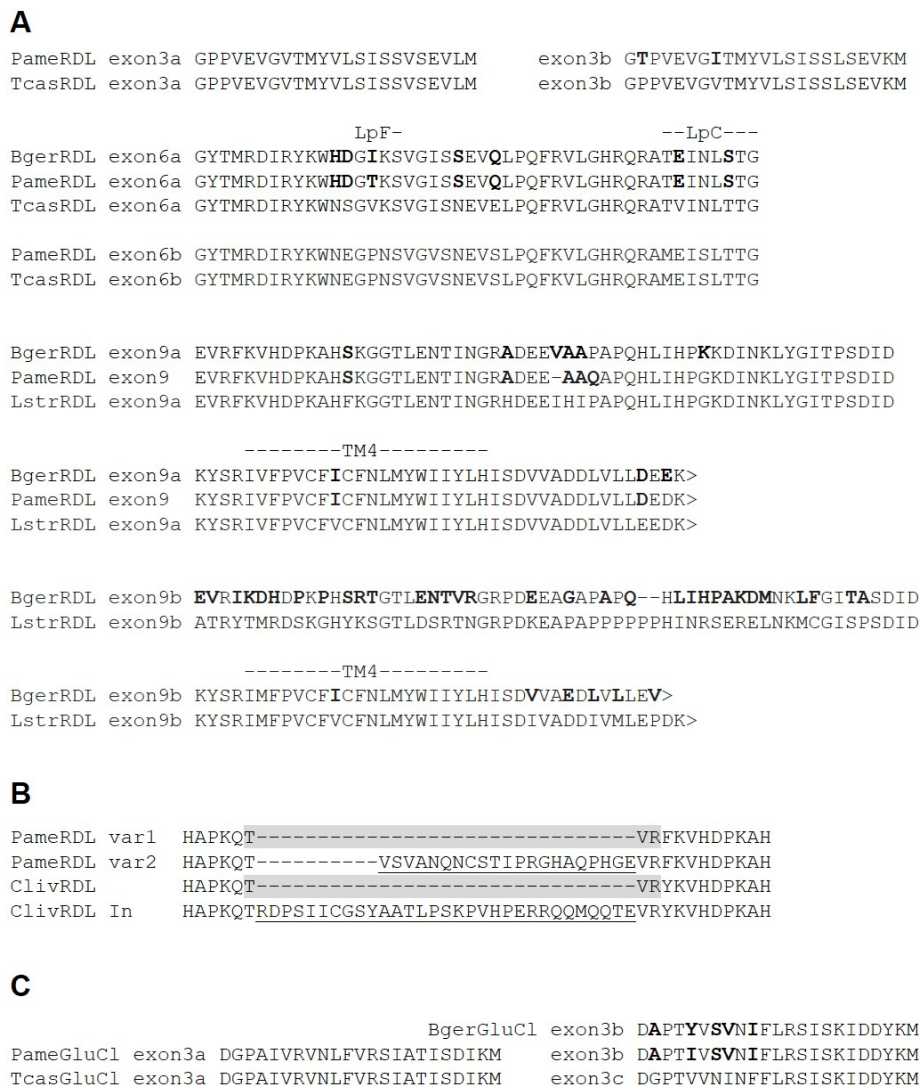


Figure 7. Alternative splicing of exons in *B. germanica* and *P. americana* RDL and GluCl subunits. (A) Splice variants of exons 3 and 6 of *B. germanica*, *P. americana* and *T. castaneum* RDLs as well as variants of exon 9 of *B. germanica* and *Laodelphax striatellus* RDLs. The fourth transmembrane region (TM4) is indicated and '>' denotes a stop codon. (B) Variants of *P. americana* and *C. lividipennis* RDLs with intracellular loops between TM3 and TM4 of varying lengths arising from differential use of splice sites. Potential protein kinase C phosphorylation sites are highlighted in grey shading. (C) Splice variants of exon 3 of *B. germanica*, *P. americana* and *T. castaneum* GluCls. Throughout the figure, cockroach residues that differ from those of the orthologous *T. castaneum* or *L. striatellus* exon are highlighted in bold and loops C to F, which contribute to ligand binding, are indicated.

190x210mm (150 x 150 DPI)

Andrew K Jones, Delphine Goven, Josy-Anne Froger, Alexandre Bantz and Valerie Raymond

Supporting information Table 1A: *Periplaneta americana* cysLGIC sequences used in this study

<i>P. americana</i> subunit	Sequence
nAChR α 1	Accession number KP725463.1
nAChR α 2	Accession number KP725464.1
nAChR α 3	Accession number KR021292.1
nAChR α 4	Accession number JN390946.1
nAChR α 5	Accession number GFCQ01005211.1
nAChR α 6	Accession number JF731243.1
nAChR α 7	Sequence determined by RT-PCR (see below) and submitted to NCBI
nAChR α 8	Sequence determined by RT-PCR (see below) and submitted to NCBI
nAChR β 1	Sequence determined by RT-PCR (see below) and submitted to NCBI
nAChR α 9	Sequence determined by RT-PCR (see below) and submitted to NCBI
nAChR β 2	Accession number GFCQ01032711.1
nAChR β 3	Accession number GFCQ01027461.1
nAChR β 4	Accession number GAWS02039241.1
nAChR β 5	Accession number GFCQ01009686.1
nAChR β 6	Accession number GFCQ01010089.1
nAChR β 7	Accession number GFCQ01012153.1
nAChR β 8	Sequence determined by RT-PCR (see below) and submitted to NCBI
nAChR β 9	Accession number GBJC01015771.1
nAChR β 10	Accession number GFCQ01027794.1
RDL	Accession number BAW87781.1
GRD	N-terminus missing. Sequence below.
LCCH3	Accession number GFCQ01015543.1
8916	Accession number GFCQ01012789.1
8916_2	Sequence compiled by tBLASTn. Sequence below.
GluCl	Accession number BAW87777
GluCl2	Accession number GFCQ01031120.1
HisCl1	Accession number GFCQ01022534.1
HisCl2	N-terminus missing. Sequence below.
pHCl	Accession number GAWS02040818.1
12344	Accession number GFCQ01007480.1
CLGC1	Accession number GAWS02050116.1
CLGC2	Accession number GFCQ01015521.1

P. americana $\alpha 7$ nAChR subunit

Sequence determined by RT-PCR and submitted to NCBI.

MPRWLLFVCICICLPRESLQGPHEKRLHLHTLLDHYNVLERPVANESDPLQLSFGTLTMQIIDVDEKNQLLITNIW
LKLEWNDVNLRWNSTEYGGVKDLRIPPHRIWKPDVLMYNSADEGFDGTYPTNVVVRDSGSCLYVPPGIFKSTCKI
DITWFPFDQRCMKFGSWTYDGFQDLQLQDDTGGDISSFITNGEWDLLGVPGRNEIYYNCCPEPYIDITFII
IRRRTLYFFNLIVPCVLIASMAVLGFTLPPDSGEKLSLGVITLLSLTVFLNMVAETMPATSDAVPLLGTYFNC
IMFMVASSVSTILILNYHHRNADTHEMSPWIKTIFLHWLPCILRMSRPGGEPDASRKNLQMRLELEKERSKSL
LANVLDIDDDFRHHTGTLQTSAAAGFLRGAHTHEDGGGGGGTLLHGGGGSSCLGPHRELTLLILKELRVITDKLR
KEDEAAEVTNDWKFAAMVVDRLCLIIFTLFTVIATIAVLFSAPIIVT

P. americana $\alpha 8$ nAChR subunit

Sequence determined by RT-PCR and submitted to NCBI.

MVMLRMRRILLFFSFLTITTTGKTTTYEANPDAKRLYDDLLSNYNRLIRPVINNTETLTVWLGLKLSQLIEVNLKN
QVMTTNLWVQKQKWDYKLRWDPEEYGGVEMLYVPSEHIWLPDIVLYNNADGNYEVTLMTKATLKHTGEVFWKPPA
IYKSSCEINVEYFFPDEQSCIMKFGSWTYNGFQVDLKHMDQVPGSNLVNVGIDLSEFYLSVEWDILEVPARRNEE
YYPCCAEPYSDITFNLTMRKTLFYTVNLIIPCVGITFLTIVLVFYLPSDSGEKVSLCVSILLSLTVFLLAEII
PPTSLAVPLLKGKYLFTMILVTLSSITVFLNVHFRSPSTHKMSPWVKRVFLHFMPRLMMRRPPYSSRDNFDD
TNFQDNGYTNEMDFRDSISDPYPPELKGSPGFESVSTAYKTALSQDEEARQHQPSSVTDSNTLPRQLSPDVLS
ALQGVRFIAQHIKADKDNEIVEDWKYVSMVLDLRFLLWVFTLACIGGTCGIIFQAPSLYDKRKPIDQELSDIPLR
KNNFQVPPDILNQSE

P. americana $\beta 1$ nAChR subunit

Sequence determined by RT-PCR and submitted to NCBI.

MNTGARALAPAGLI PAFLFFWLLVLPWCSEDEERLVRDLFRGYNKLRPVQNMTOQVDVRFGLAFVQLINVNE
KNQIMKSNVWLRVWSDYQLQWDEADYGGIGVLRLLPPDKVWKPDI VLFNADGNYEVRYKSNVLIYPNGEVLWVP
PAIYQSSCTIDVTFYFPDQOTCIMKFGSWTFNGDQVSLALYNNKNFVDLSYWKSGTWDIEVPAVYLNIEYGNHP
TETDITFYIIIRKTLFYTVNLILPTVLISFLCVLVFYLPAEAGEKVTLGISILLSLVVFLVSKILPPTSLVL
PLIAKYLLFTFIMNTVSILVTVIIINWNFRGPRTHRMPPIRAVFLYYLPVLLMRRPKKTRLRWMMEMPGMSAP
PHPSYGSPAELPKHLAVSSTNRSKMEVMELSDLHHPNCKINRKSSTELAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
SGRRESESSDLSLLSPEASKATEAVEFIAEHLRNEDQYIQIREDWKYVAMVIDRLQLYIFFLVTTAGTIGILMDA
PHIFEYVDQDRIIEIYRGK

P. americana $\alpha 9$ nAChR subunit

Sequence determined by RT-PCR and submitted to NCBI.

MAEARDVLRVWVVLVVLQLLVLTQIEVPGISAAVTDGTGTGTLP RPPGAWNATWTDRLKRNLLLNNDK FARP
AQHTNTTVVNI GMTFRHVALDELKSI MTVQGWVKMSWIDEK LKWNESYGD LGILHLANHEIWQPDIVLYNSATG
NLVEYYGNTHCLAYPNGEVLWVPPSQFQVFCDLMLWPFDTQYCHLTLSWYDGDHIDILLDKYGADVQLMET
SSEWEFMGVEETRNKTYSCCVPEYIDITFKLTLRRRSPTYS AIVITPATVIVLLTLATFWLPP TAGEKILLNGC
IAVICIFLMYFSQKLPAMAGHTPLVVLFYSSSLYMVCIA TII SVVVVNLARNQHVTPLPWV IKNLLTGWLQ I L
GLGHI IAQASALHHNMMSGNAEELREQQTAVFDDHDHMGNSSDDRQMITPRSR TSSQQD WVLLAAAI DRITFLVY
CLLFAILAIVYAV

P. americana $\beta 8$ nAChR subunit

Sequence determined by RT-PCR and submitted to NCBI.

1
2
3 MTSPVHSCVFILYLFTVYIYCAQSV EETCTV PPKTKIQTLRLKQDLLCNYDKKLRPADTRTKSTKVV PDMFLKSLT
4 YDDEHGILNVHSFTLWFWKDERLSWK PSEYENINFLVMSTDEI WVPEVARLVPSMMRNMDKETT GIGICYVYSNGY
5 VACSMVAVYA AAVCALDSTYWPYDSLNC SFRLG SWREAGDDISLSLYNKR VHQSKEYEPNEWKLLSATSTIRVDLLE
6 HNATLPWVEYRFTLQRHSFLPEVIVVAPVLVNAV MVLLNFVFLSPSDDKRITFSCVILICHCIYLQYLGMTLGNT
7 GESSPIVVRLYRDSLVLVLLGVSLVVTIALRCLSSSTDPFACIQNL TNRALS YRVGQLVILMQTSRQVTAVAKDETD
8 EDDGLIVTSSPDRDRVWVLFCKIVDRICFVVYSLWYLVLF LRWTA
9

11 *P. americana* GRD

12 N-terminus missing.

13
14
15 HRNISELLDNLLRGYDNSVRPDFGGPPAIIEVDIMVRSMPGPISEVDMYSMDCYFRQSWVDRRLAFQGNKETLALS
16 ISMLKRIWKPDYFYNGKQSYLHTITTPNKFVRLYQDGRVLYSNRLTIKAGCPMNLEDFPMDTQRCPLKFGSGYT
17 TNDVVYRWNKARQVAIAEDMKLSQFDLIATP SANQTDV LQSGSSDVALCTICEYSMLLVSFHLQRHMGNF LIQVY
18 GPCVLLVVLVSWVSFWLNREATADRITTVLTM TFLGLEARTDLPKVPYPTALDFFVFLSFAFIFATI IQFAVVHYF
19 TKYGSCECYFSSDFSSDSSSDEEEWNOGRRRTEAGEHTAGRKASGGSGAGRRADYSSPNGDTGTSSHLLLEVIPL
20 SACSITPSPSTISGRAAHQPWSMP SCLGCATGSDTARDEGSAGSSPYTPAVGTSTVHRLSVQGMRRKRKRRTPR
21 YNSVSKIDRASRIVFPLCFLAINV FYWYAYLSRSKR IHQMRTGESS
22

23 *P. americana* 8916

24 Accession number GFCQ01012789.1.

25 *P. americana* 8916_2

26
27
28
29
30 MVRVAAIIFTVAVVLTFLWNANGAVLRDYRYLSKNI TSTLDQLLNRSRYDKRIRPDFGGPPVTITVNLHIKSMGP
31 VSETEQYYVMDCYFRQNWYDRRLVFNFPGLDEFSLSWLFLDRVWKPD TFFMNGKKS YLHRI TVPNKFLRLRNDGF
32 LTYSMRLTVKASCPMHLRKFPLDSQSCPLLIGSQRYISVAVSEEF SMIKADFHMRNIGYFVLQLYVPCGLIVCC
33 SWVSFWIDPD AVPARSLGVTTVLSMTT MGFGR AQMPRVSYATALDSEFV IICFSFVFAVMIEYAAINFIDKITAD
34 LKKILQDRGVKKKSPPKIYQEIGEAA SDDKDGHLKAPDGRDRRSLVSLA APIIDSLKRNIERKKEISLHLP AIP
35 LLTQRRKSEASLSRPPPIPLITV TGNDS DVEAQTQDDRK GSEREDDVADICCEV FQEDGEE PEDNDEKDPGFML
36 IALALVIKCVMPKPMWKHTRCVPDEDDVSRLIITGETPDKFSKIDIEARKYFPVAF CILITSYWIAYLYYITDD
37 FPVKDVNRMLMKSKCISG SIGYKEKFISQND DTWAV
38

39 *P. americana* HisCl2

40 N-terminus missing.

41
42
43
44 YVNPEPTMPPESSLSLRDILPINPKHYDKNKAPRLQGGPTIVYFHVTVLSLDSINEESMTYVADIFLAQSWRDP
45 LRLPEYMSEDYRILDVDWLHDIWRPDCFFKNAKKVTFHEM SIPNHYLWLYHDKTLLYMSKLT LVLSCAMKFESYP
46 HDTQICMMIESVSHTVHDLVFIWNVTDPLV VNPDIELPQLDISNNYTTDCTIEYSTGGNFTCLAVVFTLRRRLG
47 YHLFHTYIP SALIVVMSWISFWIKPEAI PARVTLGVTSLLTLATQNTQSQQSLPPVSYVKAIDVWMSSCSVFVFL
48 SLMEFAVVNNYMGPIATKAMKGYSEQDIRLQDLAPRRGSHMRHVPTIPQYATFCNGRETALYIDKVS RFFFPPFSF
49 FILNVVYWSTFL
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supporting information Table 1B: *Blattella germanica* cysLGIC sequences used in this study

<i>P. americana</i> subunit	Sequence
nAChR α 1	Accession number PSN32586
nAChR α 2	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR α 3	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR α 4	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR α 5	Sequence complied by tBLASTn. N-terminus missing. Sequence below.
nAChR α 6	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR α 7	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR α 8	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR β 1	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR α 9	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR α 10	Sequence complied by tBLASTn. N-terminus missing. Sequence below.
nAChR β 2	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR β 3	Accession number PSN38810
nAChR β 4	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR β 5	Sequence complied by tBLASTn. N-terminus missing. Sequence below.
nAChR β 6	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
nAChR β 7	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
RDL	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
GRD	Sequence complied by tBLASTn. N-terminus missing. Sequence below.
LCCH3	Sequence complied by tBLASTn. N-terminus missing. Sequence below.
8916	Sequence complied by tBLASTn. N-terminus missing. Sequence below.
8916_2	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
GluCl	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
GluCl2	Sequence complied by tBLASTn. N-terminus missing. Sequence below.
HisCl1	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
HisCl2	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
pHCl	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
12344	Sequence complied by tBLASTn. Sequence below.
CLGC1	Sequence complied by tBLASTn. N-terminus missing. Sequence below.
CLGC2	Accession number PSN54130

B. germanica α 2 nAChR subunit

MSAPLCVVLFFALLGCVAPNPDAKRLYDDLSSNYNRLIRPVSNNDTVVLVKLGLRLSQLIDLNLKDQILTTNVWLE
HEWQDHKFRWDPQEQYGGVTELYVPSEHIWLPDIVLYNNADGEYVVTMTKAVLHHTGKVLWTPPAIFKSSCEIDV
RYFFPDQQTFCFMKFGSWTYDGGQIDLKHSQKVNSNRVEVGIDLTEYYPSVEWDILGVPAERHEKFYPCCVPEYPD
IFFNITLRRKTLFYTVNLIIVPCVGISYLSVLVFLPADSGEKIALCISILLSQTMFFLLISEIIPSTSLALPLLG
KYLLFTMILVGLSVVITIMVLNVHYRKPSTHKMAPWVRKIFIKRLPKLLLMKVPEQLLADLAMNKNRLKLGKSK
LNAAAAAAAAAAAAAAAASSSSVASSPDSLRRHHHQRPGGCNGLHSSASGATNRFGGLIAGFNGLPSVVGLDGSL
DVGTRKKYPFELEKAIHNVMF IQHMLRQDEFDAEDQDWGFVAMVLDRLFLWIF'TIATIVGTFAILCEAPALYDD
TIPIDKKYSSVYQQQFLPTTDF

B. germanica $\alpha 3$ nAChR subunit

MGDIMVFCSLVVKLGCSGNPDAKRLYDDLLSNYNKLVPRVNVSDALTVKIKLKLSQLIDVNLKNQIMTTNLWVE
 QSWYDYKQLQWDPKEYGGVEMLHVPSDHIWRPDIIVLYNNADGNFEVTLATKATLNFTGRVEWKPPAIYKSSCEIDV
 EYFPFDEQTCVMKFGSWTYDGFQVDLRHIDEVKDSNIVEIGVDLSEFYTSVEWDILEVPAVRNEKYTCCDEPYL
 DITFNITMRRKTLFYTVNLIIPCMGISFLTIVLVFYLPSSDSGEKAEIIPPTSLVVP LLGKFLVFTMI LDTFSICVT
 VVVLNVHFRSPQTHMAPWVRRVFIHILPRLLLVMRRPQYQIDKRRLLVSSARIMVRTCNGLELRDPTLLAESSASE
 LVESTHTTELFPTLDHDEFAPRELEATGLGSGCRIHGTPPLPPLCQEDGF LAPGTND DAPSPLCRHLHHWHNCP
 ELHKAIDGVKFIADHTKREEDSTRVKEDWKYVAMVLDRLFLWIFTLAVLVGTAGI IILQAPTLYDDRIPIDVRLSE
 IASTTAKPHVGPAL

B. germanica $\alpha 4$ nAChR subunit

MVCAGDALRAWVLSALVVHGAVAGNPDAKRLYDDLLSNYNKLVPRVNVTS DVLRVCIK LKLSQLIDVNLKNQIMT
 TNLWVEQSWYDYKLRWEPKEYGGVHMLHVPSDHIWRPDIIVLYNNADGNFEVTLATKATIYHQGLVEWKPPAIYKS
 SCEIDVEYFPFDEQTCVLKFGSWTYDGFQVDLRHMDKAGSNVVEVGVLDLSEFYMSVEWDILEVPAVRNEKFYTC
 CDEPYLDITFNITMRRKTLFYTVNLIIPCMGISFLTIVLVFYLPSSDSGEKVTLSISILISLHVFFLLVVEIIPPTS
 LVVPLLGKYLIFAMILVSIICVTVVVLNVHFRSPQTHKMAPWVRRVFIHILPRLLLVMRRPQYQFETNRGSCQIH
 GPAAVLQSESADELSDNKSPVLRNPAFSSHNCPEVHKSCFCVRFIAEHTKMLEDSTKVKEDWKYVAMVLDRLFL
 LWIFTLAVLVGTAGI IILQAPTLYDDRVPIDKGFNEVATVVRCPPO

B. germanica $\alpha 5$ nAChR subunit

N-terminus missing.

SVLADEQEYRLTRYLMANYDPSVRPAENSSEPLKVVFGISLHHIIDVDEKNQIILTNCWLTQIWTDDHLLKWNASD
 FAGIRVIRVPYQRVWRPDTILYNNAAADSQYNSAVINTNIVITVYTGVEVWVLSHGIFRSSCDINVEYFPFDVQSCNM
 KWASWYTDGYQVDLVKQTEAGDVSNYQANGEFDLVSFDAIRHVEFYSCPEPYPDITYVIRLRRRPMFYVFNLIIL
 PCILINGIALLVFYVPSSESGEKVTLGISALLSMTVFLMTIRESLPPTEKTPLISKYGVSI CLVSFASGLSVVTL
 NVYHRGVRGTGVPRIKALILGKLARLVFLQFEPRDKHVSPIQHVSNPRTGTRLDLDCPRPPDNKWTTDNEADYLDP
 QQMSPRFLPRRSRTDDSF EAQFLRVLNKNVNHTEIERNELRLAEQERRDVTEIEWKQVALVCDRFLWVFLTTAIT
 TTIVILCGSPYGP

B. germanica $\alpha 6$ nAChR subunit

MVSCEQVLALLAKAFVLIITMLPGSEQGAHEKRLLLKNLLDEYNI LERP VANESPLEVKFGLTLQOIIDVDEKNQL
 LITNIWLSLEWVDYLNLRWNESEYGGVKDLRITPNKLWKPDVLMYNSADEGFDGTFQTNVVVKHNGSCLYVPPGIF
 KSTCKIDITWFPFDQHCMDKFGSWTYDGNQLDLVLNSENNGDLSDFITNGEWYLI GMPGKKNITIVYQCCPEPYV
 DVTFTIQIRRTLYYFFNLIVPCVLISSMALLGFTLPPDSGEKLTGLVTILLSLTVFLNLVAETLPQVSDAIPLL
 GTYFNCIMFMVASSVVLTVVVLNHHRTADIHMPQWIKTVFLQWLPWILGMGRPGKKITRKTILMNSRMKELEL
 KERSKSLLANVLDIDDDFRNVSAGGNASMTTSLGGGFMRHPTTIEEAAMPSSGTQRDLQHILRELFITNHMK
 KADEEA EVIDSWKFAAMVVDRLFCLIIFTMFTI IATVAVLLSAPHIIVQ

B. germanica $\alpha 7$ nAChR subunit

MPRWLLFVCICICLPRESLQGPHEKRLLLHTLLDHYNVLERPVANESDPLQLSFGLTLMQIIDVDEKNQLLITNIW
 LKLEWVDVNLRWNSTEYGGVKDLRIPPHRIWKPDVLMYNSADEGFDGTYPTNVVVRDSGSCLYVPPGIFKSTCKI
 DITWFPFDQRCMKFGSWTYDGFQDLQLQDDTGGDISSFITNGEWDLLGVPGRNEIYNNCCPEPYIDITFII
 IIRRTLYYFFNLIVPCVLIASMAVLGFTLPPDSGEKLSLGTILLSLTVFLNMVAETMPATSDAVPLLGTYFNC
 IMFMVASSVSTILILNHHRNADTHEMSPWIKTIFLHWLPCILRMSRPGGEPDASRKNLQMRLELKERSSKSL
 LANVLDIDDDFRHLLHGGGGSSCLGPHRELTLLIKELRVIITDKLRKEDEAAEVTSDWKVFAMVVDRLCLIIFT
 LFTVIATIAVLF SAPHIIVT

B. germanica $\alpha 8$ nAChR subunit

mqkvlfifccvltlssghkamsYEANPDAKRLYDDLLSNYNRLIRPVINNTETLTVWLGKLSQLIEVNLKSQVMT
 TNLWVQQKWIDYKLSWDPEEYGGVDMLYVPSEHIWLPDIVLYNNADGNYEVTLMTKATLKFTEVLWTPPAIYKS
 SCEINVEYFPFDEQSCLMKFGSWTYNGIQVDLKHMDQVPGSNLVNVGIDLSEFYLSVEWDILEVPARRNEEYPC
 CQEPYSDITFNLTMRKTLFYTVNLIIPCVGITFLTIVLVFYLPSSDSGKVSLSLVSILLSLTVFFLLLAEEIIPPTS
 LAVPLLGKYLFTMILVTLSSISITVFLNVHFRSPSTHKMSPWVKRVFLHFMPRLMMRRPPYSSRDNFDDTNFQ
 DNGYTNDMDFRAVTDSDNTLPRQLSPDVLSALQGVRFAHQHIKDADKDNEVIVEDWKYVSMVLDRFFLWVFTLAC
 IGGTCGIIFQAPSLYDKRKPIDQELSDIPLRKNFLVPSEILNQSE

B. germanica $\beta 1$ nAChR subunit

MNTGARALVPAGLFPFIFFLLFFWLLVLPWCSEDEERLVRDLFRGYNKLRPVQNMTOQKVDVRFGLAFVQLINVNE
 KNQIMKSNVWLRLLVWVSDYQLQWDEADYGGIGVLRLLPPDKVWKPDI VLFNADGNYEVRYKSNVLIYPNGEVLWV
 PPAIYQSSCTIDVTYFPFDQQTICIMKFGSWTFNGDQVSLALYNNKFNVDLSDYWKSGETWDIEVPAYLNIYEGNH
 PTETDITFYIIIRKTLFYTVNLIILPTVLI SFLCVLVFYLPAAEAGEKVTLGISILLSLVVFLLLVSKILPPTS LV
 LPLIAKYLLFTFIMNTVSI LVTVIIINWNFRGPRTHRMPPIRRAVFLYLLPIVLLMRRPKKTRLRWMMEMPGMSA
 PPHPSYGSPAELPKHLAATNRTKMEVMELSDLHHPNCKINRKSSTEESESSDSLLLSPEASKATEAVEFIAEHLR
 NEDQYIQIREDWKYVAMVIDRLQLYIFFLVTTAGTIGILMDAPHIFEYVDQDRIIEIYRGK

B. germanica $\alpha 9$ nAChR subunit

MACSGALLLLLYIAFAAAITDNTGTGTLPFRPPGAWNATWTDRLKRDLLLNYDKFARPAQHTNTTTVRLGMTFRH
 IALDELKAIMTVQGWRMTWTDEKLKWNESDYGGLGVLHVADHEIWQPDIVLYNSATGNMVDHYGNTHCLAYPNG
 EVLWVPPSQFQVFCELDLRMWPFDTQTCHLTLGSWTYDGDHVDILLDKHGAEVVELMEMMEWEFVGVEDSRNVKT
 YACCIEPYIDVTYKLTLLRRRSPAYSIVITPATVIVLMTLVSEFWLPPSAGEKILLNGCTALIIICIFLLYFSQKLP
 AMAGHTPLVVLFYSSSLYLVCIA TVVSVVVMNLARNFHATPMPWI IKNLLTGWLGHILGLGHILIAQAKSLHHNMM
 SGHAEELREQQASVFEDHDMGNSDDRQMI SPRSRASSQHDWVLLAAIDRIAFLVYSLLFAILAIIVYAV

B. germanica $\alpha 10$ nAChR subunit

N-terminus missing.

DLQCPNNYTSTTTQIKLRKQVFCKYNRDIRPVRNHNETVDVQVFLMLRRLDFDEKNDKLTIHSLFHMSWYDYHLL
 WNSSDFDNIEVMRVSSYSWLKPDFDVYTSTSTWSSLYFYTVCI LYSVGSVVCVPLQDTS CSADLTRWPFDSH
 TCKMVI GSWTYAGEQINISFSNKGIGKYNYSNREWELLSTSATREVKKFSCCPNETYPSVTFEFVLKRHSGIYA
 STVIVPAIVLMLMTLLTFWMDPGRSERLFIITLDMFCHFIMLQYIEALLPSNGDKTPLLITFYRDSLILTTLALF
 CGILGKNLKISSQPIPLWASGISSLILNRRIGQMIIFRDINLKPATEISGTESEGHKTITLSTSSWDAFIAIE
 DSLFFIITLLVYIILIIIGFIP

B. germanica $\beta 2$ nAChR subunit

MDLKFIVITLIVGVVSIQTDVNTTEVYQRDCKLMFTYGYGYNKYFHISEAGTHKGRELTIRFLVRARS DAHLLLS
 PVQSPSEIMPVYEIVLGAGKNTFSDIRRLRRSSTRATSATKDLLSPIELRAFWRVLDNKGLIEVGKEGEDAPFLF
 WTDPTPLDIQYFSFCTWTGVVGGKWLDCPIANDTTEKIEVVVEEKPTTMTEKLRKDLLSNYDPYALPLHADHRII
 IFMHLYHHVPQHWMDEKIRWNPNDYGGLTDVHIKEHEVWIPEIVLYKYVGHGANILGHSGMTITSEGAVMWSPS
 ATLQVWCNINVSEWPNDHEHTCELQLGFWTQREFLELLIVDNQTVVMENEKTRSEWKIVKMEATLITAKPWIQD
 VDFDDSSSPDSLTVRITVRRQSQHYHTLLETPLVISMFLFSFWMTPESSNKIGIICICLVLALLIVTIGTLL

PAPADHVPCLVQLYSWLMVAGVVILLITTFITCITRYMHSKPPPSLLSLIVSHPIAQNALLPKLNSEQPGKSYN
 QLEESNDINESSADLSSRIITPSHQEIQQIWILIGTAVDRIACIYYIIFLIILIKCN

B. germanica β 4 nAChR subunit

MFLSSLLKCSILCILFVTGLADPECSEPI SNRLRLKLLKDLLCGYDRTVRPVKLRSDRVRVAVKFTPIFVITYDE
 EYHHFELRSQMEWVWKDEFLVWDPSRYDGVKILFMDNTQIWIPEIYQKTSEYILLHDIGGWNSFCTVNSNGWVNC
 SNDPTFYISCAIDL TNWPYDYQNCNFKIASLLQSEEKIELEI IHSVISLYAPSQGWELLKVTIDTGNFEFAHKI
 ANYIQYNLLFKRKA AVIEAAVIYPLIVLSILILSSFWIGMEPEARMNLLFSALICHPMI IYDIGYKLSASNFLMI
 TVLFFRDSIFLNVISLLIAAFIEWINKEPPAAIPTAINFILESQPAQLILLSEQPAQLILSVPLEEEPPDDDKDA
 TVSPLKKNWSDFATLIDRICFVIFTLIYIILGFKYIVFN

B. germanica β 5 nAChR subunit

N-terminus missing.

CLVVTAEGQCAQQTTPNPQSVALKDNLLFCGYDKAVSQMHQNNKVTNINITMMIKFLQEWIDERLSWQISEYSGV
 NVLHLDTTEEIWIPIPLIFYSHSFWGVGDPHPSGRCNVLPNGKMCVTSNIYTHHCAPDFTYWPQDTVNCRIFIFSV
 GQDVVFLHKEGEVNTKVNTAHYNYENYEWGLLSAMIHINGSTEYNYTYQWITLDLSLQRHNNMHRVSMFLFPVLSFL
 VLVTFWLDANEEYRIKLLCVATVCNCLQLFCIEDQVGNVTGNTPLLVKFYRDSLIMSGISFLITVAIQILLKLQY
 APNWLVPVTRFLFIMKYQLANILLISQEVTKEDTVSKENGREEDGLLKPPPIDASLEWNVVFFISVTRIELNLCFVSS
 SVMNQLLLILLSLYSYKGNVFIILLILIA

B. germanica β 6 nAChR subunit

MNQLLLILLSLYSLNFTVIFADNCEVTPAKTASLRLENLLECGYDKTVRPVIYHGNQTTVTISMKLRQEWKDE
 HLHWNPSDYEGVNTLNIAASDEIWWPEIAHYRSSYWEVERRIPYGTCEVGSTGIVRCTSDSVYYSICNAELTYWPY
 DSLNCSLLLGAWMQEGEEITIQITDNNVDLHEYEADHWWILDSATVTRHLEKYEVNSTIPWIOYSFFIRRHASLY
 EATVVLPGIILVLTTFWILPEGSNRINLCCVAVICHYLQYVGTGGEKPLVLFYRDSLILNCLAIFFA
 IVSRTLVTAAVPAWVSKYTGWILSWRFGQILLLTEMSEKKEGTGLVAATKTKPSSNWKIFVKLIDRISFVFC
 LLYIFMVIRCFV

B. germanica β 7 nAChR subunit

DLYFHLHLKALLVLIVTIGTTEGTDDDIQCPINYSTSTLVLRLKQMFQYQNVVWRPVKNYNETVNVTLRFVMQR
 IEFDEKSDILKFFGFFLMYDAHLWPWKPSDFDNIDTMRVPSWYLVFPDYGVINYGPRNQLYFYGTCLVYSDGDV
 LCTPKMTRTASCANLKYWPDTHVCKMMLGSWYSAEHLNLTLDNKP IEFENFNMNDEWKLTEGVTKMEVYKYS
 DGFNYPLITYEFLERHSGSYAASVITPAVVLMLITLAIYWMEPSQSDRIILAAVNVASHIVFLQYLRMLPPNG
 NETPLIVTFYRDSLILSAVTIVITSVIFGLRTSSQSIPLWATGISSWMLQNRFGQMIVFHNLDPKAVAEASEVSG
 EEGADLVNSFGSSIRSEWNTFTILLDFFCFTITLFFVYFILLLGFIP

B. germanica RDL

MRGVTVIQDAGVLLAATVSI LRPGTPTGFAQAATGGGSM LGD VNISA ILDSFSLGYDKRVRPNYGGTPVEVGIT
 MYVLSISSLSEVKMDFTLDFYFRQFWTDPRLAFRKRPGVETLSVGSEFIKNLWVPDFTFFVNEKQSYFHIATTSNE
 FIRIHHSGSITRSIRLTITASCMPNMQYFPMDRQLCHIEIESCGYTMRD IRYKWNENGPNSVGVSNVSLPQFKVL

1
2
3 GHRQRAMEISLTTNYSRLACEIQFVRSMGYYLIQIYIPSGLIVIIISWVSFWLNRNATPARVALGVTTVLTMTTLM
4 SSTNAALPKISYVKSIDVYLGTCFVMVFASLLEYATVGYMAKRIQMRKNRFLAIQKIAEQKAGMDTAHAPPPGP
5 PGEGDHAPKQTVSPLFQEVRFKVDHPKAHSGGTTLENTINGRADEEVAAPAPQHLLIHPKDKINKLYGITPSDIDK
6 YSRIVFPVCFICFNLMYWI IYLHISDVVADDLVLLDEEK
7
8
9
10
11
12
13

14 *B. germanica* GRD

16 N-terminus missing

17 NNHRNVSELLDNLLRGYDNSIRPDFGGPPAVVEVDIMVRSMP ISEVDMTYSMDCYFRQSWVDRRLAFQGNKETL
18 ALSISMLQKIWKPDYFYNGKQSYLHTITTPNKFVRLYQDGRVLYSSRLTIKAGCPMNFLEDFPMDTQRCPLKFGS
19 CKGYTTNDVVYRWKARQVAIAEDMKLSQFDLIATPSANQTDILYSMLLVSFHLQRHMGNFLLIQVYGPCVLLVVL
20 SWVSFWLNRNREATADRI SLGITTVLTMFTFLGLEARTDLPKVPYPTALDFVFLSFAFIFATIIQQFAVVHYFTKYG
21 SGECYFSSDLSSDSSSDEDDWNAPVRRITTRLVEVIPLSACSVIPI SGHRHQPWSMQSCLGCTSAETREREDK
22 TTMASSNVHRLSLQSQMTRKRKKRTPRYNSVSKIDRASRIVFPLCFVINVFYWYSYLSRSKRIHQMKSDSV
23
24
25

26 *B. germanica* LCCH3

28 N-terminus missing

29 ERQQQTDRELVNTQTI SRLLQGYDIRLRPNFNGGEPYLVGMDLTIASFDSISEVNMDYTI TMYLNQYWKDERLAFS
30 TDEEILTLSGDFAEKIWVPDFFANDKNSFLHDVTERNKLVRLNGDGSITYGMRFTTTLACMMDLHYYPLDSQNC
31 TVEIESDGYTVSDVVMYWKDTPVRGVDEAELPQFTIIGCETNDRKEKLATGNYQRSLSFKLQRNIGYFVFQTYL
32 PSILIVMLSWVSFWINHEATSARVALGITTVLTMFTIISTGVRSSLPRISYVKAIDIYLVMCVFVFAALLEYAAV
33 NYTYWGARAkkkkkkkTKEAEKKTKVKGSKSITVTTTTDGFATATAGATTDQQQEI IELQDLRMSPIPSIRNRHN
34 SRNYSTSSAEGLDPTKFPSPFRMNRAAGNYTFPVRSAAGLRFRGSRSHLAHHGKPKVFHALKRGASALRASMPKI
35 KDVNIIDKYSRIIFPLSFMIFNAAYWIFVYVLP SANDQK
36
37
38
39

40 *B. germanica* 8916

42 N-terminus missing

43 LARNRDMGEDLLMLKKSVLKYLGNGTTPTFHVVNKRLYPITAGNDVSRNITMVLENLLKDYESSQLPTHGRGQP
44 TIVRTNMLIRSMGPISELDMDYSMDCYFRQYWRDSRLSFLGPIKNLSLSIKMLERIWRPDYFYNGKNSYVHTIT
45 VPNKLLRITQDGDILYSMLRTIKAKCPMELRNFPMDRQSCPLILGSDAYTAQHLVYQWQSGSSVDFVKGMAALSQF
46 DLISFPQRNITLKRREGGDFSVLQVNFNLQRHTGYFLIQVYVPCILIVVLSWVSFWIHREATSDRVGLGITTVLT
47 LSTISLDSRTDLPKVRYPATDWFLLMSFFYCIATLLEFAGVHYFTKVVGSGEIPVDEEEWVDAEGSTEEILGTT
48 TDIVDTSRSPSLRSAQRRSSLICPIYNQDPLNYGLSATSSPSQQQTTHHHHVTFMTRQTQTERHVPKWRQLLY
49 CLAGDDAYRRQRQREAAALAAATSSVMKGSRGSTDVGAIAARHNSVSHIDRAARILFPASFGLLNLFYWVVYYTCQ
50 DDFGWRDPPIPSST
51
52

53 *B. germanica* 8916_2

54 mfvrlaailtiavvmfvlwtpgfaFNQDPRELSKVVTSTLDNLLDRSRYDKRIRPDFGGPPAIITVNMHIKSMGP
55 VSETDQNYVMDCYFRQTWYDRRLVFNNTGQSEFSLSWLFLDRVWKPDTFFLNGKKSYLHRTVFNKFLRLRRDGF
56 LTYSMRLTIKASCPMHLRKFPLDSQSCPLLIGSDGYTTNDVTVWVDPKKGVEPDVELSQYELVNIITTEIFPKF
57 KRGVDEYSMLKVEFHMRRNIGYFVLQLYVPCGLIVCCSWSVFWIDPDAVPARVTLGVTTVLSMTTMGFGGQAOMP
58 RVSYATALDSFVVICFSFVFAVIEYAAINFIDKVRDDLKILQDKGVKKTSPPKASPDIDPNLEPRSVSMINM
59 SSSSAHIYNEIGEPGEDKEDPNRHLSPGDARERRKSLVSLAAPPIDSLKKNIERKSEISMHLPIPLLMRRKSE
60 ASINKPPIPMITVTGNEDDIADEEVRAELQNLPPDDVINIGSDEVFEEEGEENDDDDDKEDGKCLSFVAFGVVGF

1
2
3 KCVCTMPWRIVRDTKCLPTEDEVHELILSGETREKFSRIDIESRKYFPICFCVLIVSYWVAYMYIITDDFPAKEL
4 HPLLLKSKCHV
5
6
7

8 *B. germanica* GluCl

9
10 MATVATSLWPPCVLLLLLALLLHVGCNQGKVNFREREKQVLDQILGPGRYDARIRPSGINGTDGPAIVRVNLFVR
11 SIATISDIKMEYSVQLTFREQWMDERLKFNDFFGGKIKYLTLDANRVWMPDLFFSNEKEGHFHNIIMPVYIRIF
12 PYGSVLYSIRISLTLSCPMNLKLYPLDRQICSLRMASGWTDDDLVFLWKDGDVPVQVKNLHLPRFTLEKFLTDYC
13 NSKTNTGEYSCLKVDLLFKREFSYLIQIYIPCCMLVIVSWVSFWLDQNAIPARVSLGVTLLTMTATQTSGINAS
14 LPPVSYTKAIDVWTVGCLTFVFGALLEFALVNYASRSDMHRENMKKQRRQCELEHAASLEAAADLLEDGATTFAM
15 KPLVRHPGDALTLEKVRQCEIHMOPKRENCRTWLSKFPTRSKRIDVISRITFPLVFALFNLVYWSTYLFREEAE
16 DN
17
18

19 *B. germanica* GluCl2

20 N-terminus missing

21 GAKMDHLQILDGLLNNDYDRRATPTNHLDNATTVTCELYIRSFSGISPVMTDYEVDLYLRQKWQDERLKHAEITE
22 ALDLNDPNLVKAIWKPEVYFPNAKHAEFYVTVPNVLRINPDGEILYMLRLKLTFCSCMDLSKFPLDSQVCTME
23 VASCSKTIEELSLEWKTMPVIMGKGLRMPQFEIVKIAASDCQESFQIGNYSCLVAEFHLSRSVGFHLVQSYLPT
24 ILIVVISWVSFWMDVDSVPGRTTLGVTTLLAVSSQSSGIQSGLPQVSYVKAIDVWMTCTAFVFCALLEFTFVNY
25 MWRKQPLTSEEKKKKSPEAVNGKAVARSTEGSESAAVAVTVKKCSGIEDSTLPQNVGPGPEAPPLAPNKLRRRID
26 ELSRFCFPLAFVFNVFYWSYYS
27
28
29

30 *B. germanica* HisCl

31 MWRSGKTTISWLLLLLLLLMMICTSCSAEITSLTFNDILPEDPKLYDKMRPPKKGDSPTVVHFHVTVMGLDSIDE
32 NAMTYAADIFFAQTWKDDRLRLPENMTSEYRRLLEVDWLKNMWRPDSFFKNAKSVTFQMTVPNHYIWLYKDKTI
33 LYMVKLTTLTSCAMNFMIYPHDTQECKLQMESHTTDDMIQWDPDVPLVVDENIELPQLQLVRNKTDDCSQVYST
34 GNFTCLEVVVFLKRRLLGYLHFHTYIPTCLIVIMSWVSFWIKPEAAPARVTLGVTSLLTLSTQHAKSQAALPPVSY
35 LKAVDAFMSACTVVFVFMALMEYCLVNIVLGSDSGPKPPPEPKPDRIFDLAARENARLLTGQPPVQTQPPPAQRN
36 RARAINIDRFSRVFFPLLFVAVLNVTYWVLFAEFL
37
38
39

40 *B. germanica* HisCl2

41 MLTVHVRLQVPGSFCWLSAVWLLGSVECLKYVNP GPMPPESSLSLRDILPINPKHYDKNKAPRLQGQPTIVYF
42 HVTVLSLDSINEESMTYVADIFLAQSWDRPRLRLEPEYSEDYRILDVDWLHDIWRPDCFFKNAKVTTFHEMSIPN
43 HYLWLYHDKTLLYMSKLTLVLSCAMKFESYPHDTQICMMIESVSHTVHDLVFIWNVTDPLVNPDIELPQLDIS
44 NNYTTDCTIEYSTGGNFTCLAVVFTLRRRLGYHLHFHTYIPSA LIVVMSWISFWIKPEAIPARVTLGVTSLLTLAT
45 QNTQSQQSLPPVSYVKAIDVWMSVSVFVFLSLMEFAVVNNYMGPIATKAMKGYSEQDIRLQDLAPRRGSHMRHV
46 PTIPQYATFCNGRETALYIDKVSRRFFFPFSFFILNVVYWSTFL
47
48
49

50 *B. germanica* pHCl

51 MGLFVELLRAAAAILLILWHVVRGSDFFEEGKSDKEILDNLLVTTRYDKRLRPTVQGGPLTVNVSVLLLLSLASPDES
52 SLKYEVEFLLQQQWFDPRKYSNKSEYEFNLAIHHHNDIWLDPDYFIMHGDFKDPLIPVHFALRIYRNGTVSYLM
53 RRHLILSCQGHLLHIFPDDPQCSFAMESVSYEQTAITVWKNDEDTLRKSPSLTTLNAYLISNRTVTCPTKSSWR
54 GNYSCLKVDLIFTRDRAFYFTTVFIPGIIIVTSSFITFWLEWNAVPARVMIGVTMLNFFTTNSNFRGTLPPVSN
55 LTAMNVWDGVCMCFIYASLLEFVCVNYVGRKRPLHNVVYRPGENPVTQVCQRNMGSHSELLTLLGDKNKRETSGP
56 NEIVSCTNCGPNPCTHAANNGCATEVRKKEPPHPPIRVAKTIDVIARITFPTAYAVFLIFFFIHYKGF
57
58
59
60

B. germanica 12344

MIARGLLFCLTILLMSLSCSISKKNYTIKPRVVL PENYVKEVRPPSPKGEPTIEFSIYIVDINSINVEDMDFRV
DMFIRQRWIEPRLDMPDDIFEEGDDYVTLPPPEFFDNLWQPDYILNSKVSEIARLTHKFSSVTLYRNKTVRYAAR
MHAILACQMEFQLYPMDIQSCPMFIESFSYNNQKLRRLRWAEDGVTLNPELKLQYNVGGQPLELKETTGMYTEREA
NFSRLVMYFRFERQIGHHLIQTFAPSTLVVMLSWSFSFWIGLDAIPGRVTLVTSMLTLVMTFTGLKSDIPPVAYV
KALDLWMAGCMVFVFAALGEFAVVKVLVDVRYQLQKNAKVASIPRILPMRIQAVDNKTHCVTAWDVETPGIRCRKP
SLSLKNRRFLQLAWLDHKTGEEKILWKEIDRQSRIYFPAFFLLFVVFYWPILLKKTG

B. germanica CLGC1

VRACSEMKNNTSSGTEILNGLTSPCRYDRFTRPLAGEAPVRVHVRMHVYFLGAIEAQSLQFSAHILLRRLRWTDP
LEYDKVAPHLPLLVREGTPRELRWTPHIYLVNERESVVMGADRKDVLVTVQPDGTVILSARMKVTLFCLMNLQKF
PFDQQHCPLVMESCKCNASHMMSWEPDSPVTVNKDLHLTEYRLVNLLSNFSFANYSLVESVSPTFSPHSSMYGK
FGGNYSALTVRFDLAREVGHYIMDYFVPSILLVVVSWVSEWLDPNVAVPGRTTLGTSTMLTFITLTRNTGSSLPKV
SYIKATEIWFIVCTAFIFGSLVEFAFVNTIWRKKNVELKKNVSKYILKSTLPTMARKQMGSSASSIDRSVRT
DPGPGYNEVVIPVPTPGAPPNTNTGFTTMTTPQQIAQWIDKRSRVFFPATFIFLNVLYWGFVWM

Andrew K Jones, Delphine Goven, Josy-Anne Froger, Alexandre Bantz and Valerie Raymond

Supporting information Table 2: Sequence of primers used for RT-PCR amplification of *P. americana* cysLGIC subunits

Subunit	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
Pame α 1	ATGGGGAGCGTGTTTCTG	TCTTCAGTCCTCCTCCGG
Pame α 2	CATAGAATGGACGGCGAC	CTGCTAGAATTCCAAGTCGG
Pame α 3	GCAGAAGATGAGGAACCTTT	TTCAGAGGCCAGTGGCTA
Pame α 4	AACGAGATGGTGTGTGCCG	TGCTACTGTGGTGGGCAAC
Pame α 5	ACTGATGCCCCGCTTGAT	TCAGGGTCCGTATGGAGAAC
Pame α 6	ATGACATCGTCAGCCCAG	GCTACTGAACGATGATATGGG
Pame α 7	ACCATGGAGTCAACAGCAG	GATTACGTACGATGATGTGG
Pame α 8	GCAATGGTAATGCTTCGAATG	GGACTTATTCGCTCTGGTTG
Pame α 9	GCGACACTAGAGCAGTTACA	TTAGACTGCGTACACGATGG
Pame β 1	ACCATGAACACGGGGGC	CTTCTCATTTCCCACGATAGATCTC
Pame β 2	ATGGACATCAAGCTTGTGC	CAAGATGAGTCTGTTTAGTTGTATT
Pame β 3	ATGTACTGGATAAAGATTGTGT	TCACAGATAATAGCAATAATACAC
Pame β 4	CACCATTTTAAAATGATTGGAAAT	TACACGTGTCCTAAAATATGTAT
Pame β 5	ATGCATTACGTTGGTGTGCAT	TTAAGTATCCATCTTATGAATATG
Pame β 6	GGTTTAGTATGCGTTATCTGAAA	GAGTTAAGTGAAACATCTGATGG
Pame β 7	GACCATGCTAAACTTATGGACTAC	TTACGGTATAAAACCCACCAGA
Pame β 8	ATGACTTCACCCGTGCATTCT	TCCCATCAAGCAGTCCATCTAAG
Pame β 9	ATGGCTTCAACTCTGCCG	TTACGGTATAAATCCCACCAGAA
Pame β 10	GCTATGGGGAAAATTTCTGTTCT	CTACGGGATGAACCCAC
PameRdl	AGTATAGACTGTCCTGCCTG	CTATGATCTCGGATCGTGCT
PameGluCl	ATTGCTGCAGCTAACCGTGT	GCATCTGGACCGCGAGTTCT
PameGluCl2	TTCACCGCTCTGCAGTTGAT	AGCCTTGGAGCTCTACCAGT
PameGRD	AACAACCACAGGAACATATCCGA	TTACGAAGATTCACCGTTTCGC
PameLCH3	TCTCGAGCTTAGAACGTGTG	CCAGCCCTGGGTATCTATGT
Pame8916	CAAGTACAGTCAGAAAAGCAGG	CAAGTGAGATAGTTTTAGCGCA
Pame8916_2	ACCGCAGTATTTGCAAGTA	CACTGCAGTTAGTCCGTGAA
PameHisCl	GCAGAGGCTTGCCAATTGAT	GGTCCATGCGAAGAGTGGTT
PameHisCl2	CGATATGTTAATCCAGAACCCA	TTACAAGAATGTTGACCAATAAACAA
PamepHCl	TGTCCGCACTGACTCATGTT	GGTGCACCACCGATCATCAA
Pame6927	ATGGCGAGTGGTGTCAACCT	CGACACTTGCCTCAGAACTACA
Pame7589	CTGCATCTGCATGTGAGTGT	CGAATTAGCCACATCTCATCA
Pame12344	CCACTGCTCGGTATGGTTCA	TGCGATCCCGTTGGAAGTAG

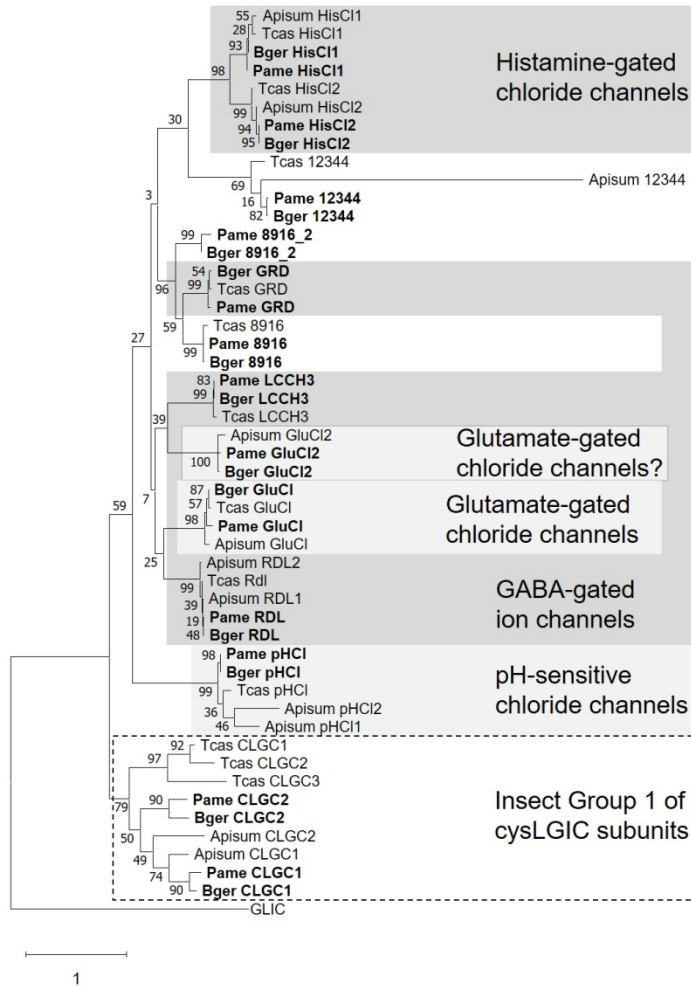
1
2
3 **Andrew K Jones, Delphine Goven, Josy-Anne Froger, Alexandre Bantz and Valerie Raymond**
4
5

6 **Supporting information Table 3: Evolutionary distance estimates between PameGluCl2 or**
7 **Pame8916_2 with *T. castaneum* cysLGIC subunits.** The number of amino acid differences per site
8 from between sequences are shown.
9

	Full length subunit sequence		Extracellular N-terminal region	
	PameGluCl2	Pame8916_2	PameGluCl2	Pame8916_2
TcasRDL	0.54787	0.56383	0.60215	0.54839
TcasGRD	0.59043	0.48936	0.58065	0.41935
TcasLCCH3	0.51064	0.53723	0.53763	0.54839
Tcas8916	0.58511	0.48404	0.59140	0.40860
TcasGluCl	0.49468	0.57447	0.58065	0.54839
TcasHisCl1	0.57447	0.65426	0.63441	0.70968
TcasHisCl2	0.55319	0.62766	0.63441	0.65591
TcaspHCl	0.62766	0.68085	0.67742	0.66667
Tcas12344	0.63830	0.66489	0.75269	0.72043
Tcas6927	0.59043	0.67553	0.67742	0.69892
Tcas7589	0.61702	0.68085	0.68817	0.73118
Tcas11340	0.65426	0.67553	0.72043	0.73118

26
27
28 Full length amino acid sequences or the extracellular N-terminal region without the signal peptide
29 were used for PameGluCl2 or Pame8916_2 that were compared to full length or N-terminal regions,
30 respectively, of *Tribolium* subunits. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X using pairwise
31 distance. All positions containing gaps and missing data were eliminated (complete deletion option).
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

Andrew K Jones, Delphine Goven, Josy-Anne Froger, Alexandre Bantz and Valerie Raymond



Supporting information Figure 1. Tree showing relationships of *B. germanica*, *P. americana*, *A. pisum* and *T. castaneum* non-AChR subunit protein sequences. The sequences used are the same as those used in Figure 6 but with only the N-terminal extracellular domains without the signal peptide. Numbers next to branches signify bootstrapping 1000 times represented as a percentage of trees in which the associated taxa clustered together. GLIC (Accession number 2XQ3_A), from *Gloeobacter violaceus*, a bacterial ancestor of cysLGICs, was used as an outgroup. The tree is drawn to scale and the scale bar represents substitutions per site.

188x306mm (150 x 150 DPI)

Étude 3 : Analyse des modifications cellulaires et physiologiques induite par une exposition à une dose sublétales d'Imidaclopride chez la blatte *P. americana*: Rôle de la sous-unité nicotinique $\alpha 2$ dans la diminution de la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride.

Depuis plusieurs décennies, les insecticides néonicotinoïdes représentent le moyen de lutte le plus utilisé contre les insectes ravageurs de culture. Une exposition de l'insecte à une dose sublétales d'insecticide pourrait conduire à des modifications physiologiques et cellulaires qui contribueraient à l'adaptation des insectes et à une diminution de leur sensibilité aux insecticides. Ainsi, le but de notre étude est de démontrer qu'une exposition subchronique à une dose sublétales du néonicotinoïde Imidaclopride est suffisante pour induire des modifications physiologiques et moléculaires conduisant à une perte de sensibilité à l'Imidaclopride chez la blatte *P. americana*. Dans cette étude, nous avons rapporté, grâce à des tests toxicologiques, que l'exposition pendant 30 jours à une dose sublétales d'Imidaclopride diminuait la sensibilité des blattes vis-à-vis de cet insecticide. Cette diminution de sensibilité est également observée 30 jours après l'arrêt de l'intoxication chronique à l'Imidaclopride. Ces résultats montrent que les blattes peuvent s'acclimater à leur environnement et deviennent moins sensibles à l'Imidaclopride lorsqu'elles y sont préalablement exposées à de faibles doses. De plus, cette exposition subchronique induit i) de faibles changements des activités des enzymes de détoxification (Glutathion S-transférase et carboxylestérases) et ii) une diminution significative de l'ARNm de la sous-unité nicotinique $\alpha 2$. Cet effet moléculaire qui est maintenu 30 jours après l'intoxication chronique à la dose sublétales d'Imidaclopride est corrélé à la diminution de la sensibilité à l'Imidaclopride des blattes. En utilisant l'interférence ARN, nous avons montré le rôle majeur de la sous-unité nicotinique $\alpha 2$ dans la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride. En effet, la diminution de l'expression de la sous-unité nicotinique $\alpha 2$ induite par l'ingestion de dsRNAs dirigés contre cette sous-unité est associée à une perte de sensibilité de la blatte à l'Imidaclopride. Ainsi, ce travail renforce nos connaissances sur l'implication des sous-unités nicotiques dans la modulation de la sensibilité des insectes à l'Imidaclopride et conduit à une meilleure compréhension des mécanismes d'acclimatation mis en place par l'insecte permettant d'envisager de nouvelles stratégies de gestion durable des insectes résistants.

Cette étude fait l'objet d'un article en 1^{er} auteur soumis pour publication. Dans ce travail, les dosages de l'activité des enzymes de détoxification ont été réalisés en collaboration avec Myriam Siegwart et Sandrine Maugin du laboratoire PSH de l'INRAE d'Avignon.

“Exposure to a sublethal dose of imidacloprid induces cellular and physiological changes in cockroaches : role of $\alpha 2$ nicotinic subunit”, *Journal of Pest Science* (Soumis)

Alexandre Bantz¹, Delphine Goven¹, Myriam Siegwart², Sandrine Maugin², Valérie Raymond¹

Partie 3 : Résultat – Etude 3

1 : Laboratoire Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et des Récepteurs (SiFCIR), UPRES EA 2647, USC INRAE 1330, SFR QUASAV 4207, Université d'Angers, UFR Sciences, Angers Cedex, France

2 : INRAE, UR 1115 PSH, Plantes et Systèmes de culture Horticoles, 84000 AVIGNON, France

Journal of Pest Science

Exposure to a sublethal dose of imidacloprid induces cellular and physiological changes in cockroaches: role of $\alpha 2$ nicotinic subunit --Manuscript Draft--

Manuscript Number:							
Full Title:	Exposure to a sublethal dose of imidacloprid induces cellular and physiological changes in cockroaches: role of $\alpha 2$ nicotinic subunit						
Article Type:	Original Article						
Keywords:	insect; nicotinic receptor; insecticide sensitivity; acclimation; RNA interference						
Corresponding Author:	VALERIE RAYMOND University of Angers: Universite d'Angers FRANCE						
Corresponding Author Secondary Information:							
Corresponding Author's Institution:	University of Angers: Universite d'Angers						
Corresponding Author's Secondary Institution:							
First Author:	Alexandre Bantz						
First Author Secondary Information:							
Order of Authors:	Alexandre Bantz Delphine Goven Myriam Siegwart Sandrine Maugin Valerie Raymond						
Order of Authors Secondary Information:							
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>INRAE</td> <td>M Alexandre Bantz</td> </tr> <tr> <td>Region Pays de La Loire</td> <td>M Alexandre Bantz</td> </tr> <tr> <td>RFI Objectif Vegetal</td> <td>M Alexandre Bantz</td> </tr> </table>	INRAE	M Alexandre Bantz	Region Pays de La Loire	M Alexandre Bantz	RFI Objectif Vegetal	M Alexandre Bantz
INRAE	M Alexandre Bantz						
Region Pays de La Loire	M Alexandre Bantz						
RFI Objectif Vegetal	M Alexandre Bantz						
Abstract:	<p>Neonicotinoids are the most important class of insecticides used as pest management tools during several decades. Exposition of insect to sublethal dose of insecticide induces physiological and cellular changes that could contribute to the adaptation of the insects in order to loss their sensitivity to insecticides. The aim of our study is to demonstrate that a subchronic exposure to a sublethal dose of a neonicotinoid imidacloprid is sufficient to induce molecular changes leading to a loss of imidacloprid sensitivity. We reported that in cockroaches <i>Periplaneta americana</i>, subchronic exposure to a sublethal dose of imidacloprid induced weak changes in detoxification enzyme activity and a significant decrease of the nicotinic $\alpha 2$ mRNA. This molecular effect is correlated to a decrease of imidacloprid sensitivity of cockroaches. Using RNA interference, we shown the key role of nicotinic $\alpha 2$ subunit in imidacloprid sensitivity. Thus, quantitative changes in insecticide targets lead to decreased sensitivity to insecticides. This parameter needs to be considered in order to develop sustainable insect resistance management strategies.</p>						

[Click here to view linked References](#)

1 **Title page**

2 **Title:** Exposure to a sublethal dose of imidacloprid induces cellular and physiological changes in cockroaches :
3 role of $\alpha 2$ nicotinic subunit

4

5 **Authors:** Alexandre Bantz¹, Delphine Goven¹, Myriam Siegwart², Sandrine Maugin² & Valérie Raymond¹

6

7 **Affiliations:**

8 1- Laboratoire “Signalisation Fonctionnelle des Canaux Ioniques et Récepteurs” (SiFCIR), UPRES-EA 2647, USC
9 INRAE 1330, Université d’Angers, SFR 4207 QUASAV, 49045 Angers, France

10 2- INRAE, UR 1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles (PSH), 84914 Avignon, France

11

12 **Corresponding author :** Valérie Raymond, valerie.raymond@univ-angers.fr

13 **ORCID :**

14 - AB : 0000-0003-4095-4418

15 - DG : 0000-0002-7278-0486

16 - MS : 0000-0003-4717-5273

17 - VR : 0000-0002-8547-0671

18

19 **Abstract**

20 Neonicotinoids are the most important class of insecticides used as pest management tools during several decades.

21 Exposition of insect to sublethal dose of insecticide induces physiological and cellular changes that could

22 contribute to the adaptation of the insects in order to loss their sensitivity to insecticides. The aim of our study is

23 to demonstrate that a subchronic exposure to a sublethal dose of a neonicotinoid imidacloprid is sufficient to induce

24 molecular changes leading to a loss of imidacloprid sensitivity. We reported that in cockroaches *Periplaneta*

25 *americana*, subchronic exposure to a sublethal dose of imidacloprid induced weak changes in detoxification

26 enzyme activity and a significant decrease of the nicotinic $\alpha 2$ mRNA. This molecular effect is correlated to a

27 decrease of imidacloprid sensitivity of cockroaches. Using RNA interference, we shown the key role of nicotinic

28 $\alpha 2$ subunit in imidacloprid sensitivity. Thus, quantitative changes in insecticide targets lead to decreased sensitivity

29 to insecticides. This parameter needs to be considered in order to develop sustainable insect resistance management

30 strategies.

31

32 **Keywords:** insect; nicotinic receptor; insecticide sensitivity; acclimation; RNA interference

33

34 **Declarations**

35 **Funding:** This work was supported by INRAE, Région Pays de la Loire and RFI Objectif Végétal.

36 **Conflicts of interest:** The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this
37 article.

38 **Ethics approval:** Not applicable

39 **Consent to participate:** Not applicable

40 **Consent for publication:** Not applicable

41 **Availability of data and material:** The authors declare that data supporting the findings of this study are available
42 within the article and the NCBI database.

43 **Code availability:** Not applicable

44

45 **Key message**

46 Exposure to sublethal dose of imidacloprid induces physiological changes leading to a decreased sensitivity of
47 cockroaches to this insecticide.

48 This acclimation persists overtime in absence of imidacloprid exposure.

49 Modifications of nicotinic subunit expression are part of these physiological changes.

50 The key role of $\alpha 2$ nicotinic subunit in imidacloprid sensitivity was demonstrated using RNA interference.

51

52 **Author Contribution Statement**

53 VR and DG conceived and designed research. AB conducted all experiments. MS and SM contributed to enzymatic
54 bioassay. AB, DG, MS and SM analysed data and VR coordinated the study. VR, DG and AB wrote the manuscript
55 and MS and SM helped draft the enzymatic bioassay part of the manuscript. All authors read and approved for
56 publication the manuscript.

57

58

59 **Text**

60 **Introduction**

61 Agriculture has to face a great challenge which is the increased needs for food of a growing population and the
62 protection of the environment. Since few years, control and management of pest insects have become one of the
63 most important global priorities. Indeed, crop protection against pest insects is one of the major component to keep
64 and improve crop yields. Chemical pesticides are among the most widely used tools for pest control (Casida and
65 Durkin 2013) and appear important to preserve the quality of agricultural production at a moderate cost. However,
66 widespread use of pesticides during several decades leads to the emergence of resistance resulting in a decrease in
67 their efficacy (Bass and Jones 2018). Indeed, along decades of use of pesticides in order to protect and enhance
68 crop yields, it appears that an increasingly number of insect species can cope with higher dose of pesticide. The
69 selective pressure induced by the use of insecticide compounds promotes the expansion of insects developing
70 peculiar mechanisms that allow them to resist effectively against treatments. These mechanisms have been well
71 studied (Ffrench-Constant 2013; Ffrench-Constant et al. 2016; Zalucki and Furlong 2017; Balabanidou et al. 2018;
72 Pavlidi et al. 2018). Insecticide resistance resides in physiological, cellular and molecular changes that can affect
73 directly insecticide targets, metabolism or behaviour. Among the well-known mechanisms, mutations of the
74 insecticide targets, increased activity of detoxification enzymes, thickening of the cuticle or behavioural avoidance
75 are considered as critical phenomena in the development of resistance. However, these last years, scientists have
76 brought their attention on the effect of sublethal doses of insecticides that could contribute to the development of
77 insect resistance (Guedes et al. 2017; Bantz et al. 2018).

78 Following a field application of insecticides, a spatial and temporal dispersal of compounds could occur. In fact,
79 insecticides degrade over time and can volatilize with wind. Therefore, the concentration of products initially used
80 to kill pests decreases until it becomes sublethal (Vryzas 2018). As it has been shown for neonicotinoids (Bonmatin
81 et al. 2015), decline of environmental pesticide concentration could occur over a long period ranging from a few
82 months to several years. In this case, organisms may be exposed to low doses of insecticides that do not induce
83 lethal effect. Nevertheless, exposure to a sublethal dose of insecticides could also induce different effects on insect
84 physiology favouring the development of resistant or adapted insects (Bantz et al. 2018). It has been demonstrated
85 that exposure to a sublethal dose of insecticide can stimulate biological processes in order to increase insect
86 survival and reproduction (Lalouette et al. 2016; Rix et al. 2016; Zhao et al. 2018). However, adverse effects of
87 sublethal doses on honeybees and bumblebees have also been reported in the literature (Feltham et al. 2014; Catae
88 et al. 2018; Tison et al. 2019). Thus, increase our knowledge on the impact of sublethal doses of insecticides is

89 necessary to improve pest control. In our study, we focused on the effect of sublethal dose of imidacloprid which
90 is the first neonicotinoid insecticide launched in 1991. Neonicotinoids are one of the most important chemical
91 classes of insecticides (Ihara and Matsuda 2018; Matsuda et al. 2020). Their success is mainly due to their efficacy
92 against a range of insect pests by foliar, soil and seed treatment applications. They act mainly as selective agonists
93 on insect acetylcholine receptors (nAChRs) (Matsuda et al. 2020). Efficacy of neonicotinoids on insect nAChRs
94 depends on many cellular and molecular factors such as subunit composition or
95 phosphorylation/dephosphorylation process (Raymond et al. 2017). Insect resistances to these insecticides were
96 attributed to modifications of the detoxification enzyme activity or target-site mutations but also quantitative
97 changes in nAChR subunits (Bass et al. 2015; Zhang et al. 2015; Matsuda et al. 2020). The impact of subchronic
98 exposure to a sublethal dose of imidacloprid was studied previously on cockroach *Periplaneta americana*
99 neurosecretory cells called dorsal unpaired median (DUM) neurons (Benzidane et al. 2017). DUM neurons which
100 are commonly used as biological models to study the mode of action of insecticides (Pelhate et al. 1990) are known
101 to express two distinct α -bungarotoxin-insensitive nAChR subtypes named nAChR1 and nAChR2 (Courjaret and
102 Lapied 2001; Bodereau-Dubois et al. 2012; Sun et al. 2017). These nAChRs can be distinguished according to
103 their pharmacological profiles and to their subunit composition. Indeed, only nAChR1 is sensitive to imidacloprid
104 (Courjaret and Lapied 2001) and it has been shown that $\alpha 3$, $\alpha 8$ and $\beta 1$ subunits were involved in nAChR1 subtype
105 whereas $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\beta 1$ subunits participated to nAChR2 subtype (Sun et al. 2017). Using patch-clamp recordings,
106 it was demonstrated that subchronic exposure of cockroaches to a sublethal dose of imidacloprid decreased the
107 sensitivity of the DUM neurons to imidacloprid without modifying the sensitivity of these cells to nicotine
108 suggesting that i) the sensitivity of nAChR1 to imidacloprid and the nAChR1 activity were diminished and ii) the
109 functionality of nAChR2 was increased (Benzidane et al. 2017). As no change in expression level of subunit
110 forming nAChR1 was observed in quantitative PCR experiments, this decrease of nAChR1 sensitivity to
111 imidacloprid was linked to the increase of basal calcium level that could activate calcium-dependent
112 phosphorylation/dephosphorylation pathways. Interestingly, it has been demonstrated that the function of nAChR2
113 which is insensitive to imidacloprid was increased and that the expression of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits involved in
114 the subunit composition of nAChR2 was significantly modified (Benzidane et al. 2017). We suggest that cellular
115 mechanisms elicited by a sublethal dose of imidacloprid and observed on DUM neurons could lead to a decrease
116 sensitivity of whole cockroach organisms to this insecticide when the cockroaches are exposed to the same
117 imidacloprid treatment. The purpose of our study is to determine which main mechanism is involved in the
118 adaptation of cockroaches to an exposure to a sublethal dose of imidacloprid in order to develop new strategies for

119 pest management. In our study, we demonstrate that a subchronic exposure to a sublethal dose of imidacloprid
120 affects the sensitivity of the cockroaches to this insecticide and this effect is maintained over time. Moreover, we
121 made a focus on the $\alpha 2$ nicotinic subunit for which it has been shown that the subchronic exposure of the cockroach
122 to a sublethal dose of imidacloprid decreased its expression (Benzidane et al. 2017) and we show that if we only
123 decrease the expression of this subunit, we obtain a decrease on the sensitivity of the cockroaches to imidacloprid
124 similar to that observed after a subchronic exposure to a sublethal dose of imidacloprid. Thus, the $\alpha 2$ subunit play
125 a crucial role in the adaptation of the cockroaches to imidacloprid treatment. To take into account these results
126 which contribute to better understand how insect can derive benefit from an exposure to a sublethal dose of
127 insecticide could be important to develop news tools for pest management.

128

129 **Materials and Methods**

130 **Insects**

131 Experiments were performed on adult male cockroaches *Periplaneta americana*. There were reared under standard
132 conditions in our laboratory at 28°C with a photo-cycle of 12 h light / 12 h dark.

133 **Insecticide exposure**

134 Imidacloprid (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) stock solution (100 mg/ml) and subsequent
135 dilutions were prepared as previously described by Benzidane et al. (2017). To determine lethal doses 10, 50 and
136 90 (LD₁₀, LD₅₀ and LD₉₀ respectively), cockroaches were treated by ingestion of 10 μ l of sucrose solution (10%
137 w/v) containing the different doses of imidacloprid ranging from 0.01 μ g to 20 μ g/cockroach and mortality rate
138 was estimated 48 h after exposure. To study the effect of subchronic exposure to a sublethal dose, cockroaches
139 were daily and orally exposed *ad libitum* 30 days to imidacloprid sublethal dose (0.025 μ g/cockroach) used in
140 Benzidane et al. (2017). Control experiments were performed under the same experimental conditions without
141 imidacloprid. Mortality rate was then evaluated after acute intoxication using three different doses (LD₁₀, LD₅₀
142 and LD₉₀) at the 30th day and also after a resting period of 30 days without imidacloprid exposure. For all
143 experiments at the 30th and the 60th day, 2 groups of cockroaches named respectively control and exposed
144 cockroaches were used.

145 **Curve fitting and data analysis**

146 Using GraphPad Prism version 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), mortality curves were plotted as a
147 nonlinear regression and fitted according to the Hill equation, $Y = m + (X^{nH}) \frac{(M-m)}{X^{nH} + LD_{50}^{nH}}$, where Y is the
148 percentage of mortality observed at the dose value X , m and M are respectively the minimum and maximum values

149 of the fitting curve, nH is the Hill coefficient and LD_{50} is the dose of imidacloprid leading to 50% of mortality.
150 Results were expressed as means \pm S.E.M..

151 **Enzymatic bioassay**

152 Detoxification metabolism of american cockroaches has been assessed by measuring enzymatic activities of
153 Glutathione S-Transferase (GST) and carboxylesterases (CE), two of large detoxification enzyme families
154 commonly associated with pesticide metabolic resistance, as previously described (Siegwart et al. 2017). Briefly,
155 dissections were performed in a climatic chamber at 11°C to limit insect movement and reduce biochemical
156 reactions. Living cockroaches were immobilized ventral side up on ice. After removing the ventral cuticle, the
157 content of the abdominal cavity was extracted and homogenized in 800 μ l of Hepes buffer (50 mM pH 7) on ice.
158 The homogenate was centrifuged for 15 min at 10 000 g. The supernatant was transferred to a new tube and stored
159 at -80°C before being used as a source of proteins for the measurement of GST and CE activities. When all
160 extractions were finished, these supernatants were used as enzyme sources for reactions in a single test to limit
161 handling errors.

162 The total protein content of each sample was measured using the Bradford protocol with bovine serum albumin to
163 build the standard curve (Bradford 1976). The absorbance was measured using a microplate reader (Infinite 200,
164 Tecan, Männedorf, Switzerland).

165 *Glutathione S-transferase (GST)*

166 GST activity was determined in transparent microplates (96-wells, Sterilin®, Newport, UK) using 2,4-dinitro-
167 chlorobenzene (CDNB) as substrate (Nauen and Stumpf 2002). The reaction mixture in one well was made of 2
168 μ l of enzymatic extract, 198 μ l of a solution containing: 10 μ l of 50 mM glutathione (GSH), 185 μ l of Hepes buffer
169 (50 mM, pH 7.0) and 3 μ l of 50 mM CDNB. Three wells per microplate filled with 2 μ l of Hepes buffer (50 mM,
170 pH 7.0) instead of enzyme extract were used as blank. Absorbance was measured after 2 min of incubation at 25°C
171 in kinetic mode every 30 s at 340 nm. We used the molar extinction coefficient ($9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) of CDNB-
172 glutathione to convert absorbance in μ mol of CDNB-glutathione.

173 *Carboxylesterases (CE)*

174 The same protein extracts were used as for GST activity measure. Total non-specific CE activity was measured
175 with α -naphthyl acetate (α -NA) as substrate (Reyes et al. 2007). The reaction mixture was 1 μ l of protein extract
176 added to 194 μ l of 30 μ M α -NA in Hepes buffer (50 mM, pH 7.0) in each microplate well. After 20 min of
177 incubation at 22°C in darkness, the reaction was stopped and coloured by adding 55 μ l of 0.2% Fast Garnet GBC
178 diluted in 2.5% sodium dodecyl sulphate solution. Absorbance was recorded at 590 nm, after incubation for 20

179 min in darkness at room temperature. The standard curve with α -Naphthol (0-18 nmoles/well) was realized to
180 express activity in nmoles of product/min/mg of total proteins.

181 **Double-strand RNA synthesis and ingestion**

182 The double stranded RNA (dsRNA) were produced with MEGAscript T7 kit (Ambion, Grand Island, NY, USA)
183 according to the manufacturer's instructions. Briefly, the dsRNA template (100 pb) targeting the α 2 subunit
184 sequence (accession number JQ585635.1) was amplified by PCR with the forward primer 5'-
185 TAATACGACTCACTATAGGGATGGACGGCGACCCTCCGTG-3' and the reverse primer 5'-
186 TAATACGACTCACTATAGGGGAACTAATAACACCATAATA-3', each containing the T7 RNA polymerase
187 promoter sequence (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'), from the recombinant PCR-Blunt plasmid including
188 the α 2 subunit sequence previously constructed in our laboratory. In parallel, the dsRNA template of the bacterial
189 LacZ sequence (100 pb) obtained after a PCR amplification using primers containing the T7 promotor sequence
190 (forward primer: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGATGACCATGATTACGCCAAG-3' and reverse primer: 5'-
191 TAATACGACTCACTATAGGGTGGCGGCCGTTACTAGTGGA-3') was used as control. Then, PCR products
192 were purified with NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) and quantified
193 using the GeneQuant[™] 100 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). The transcription
194 reaction was performed overnight at 37°C on 100 ng of PCR product in a reaction mix (20 μ l) containing 2 μ l of
195 NTPs, 2 μ l of T7 RNA polymerase and 2 μ l of T7 10X Buffer. A DNase treatment is carried out and transcription
196 products were then purified with NucleoSpin[®] miRNA kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). Finally, dsRNAs
197 were denaturated at 95°C during 5 min followed by a rehybridization step of 1 h 30 min at room temperature and
198 the quality of the produced dsRNA were examined by agarose gel electrophoresis.

199 For dsRNA ingestion experiments, cockroaches received dsRNA lipoplexes. The dsRNA lipoplex solution was
200 prepared according to the protocol described by Lin et al. (2017). Thus, 0.5 μ g of dsRNA (0.2 μ g/ μ l) were mixed
201 with 1 μ l of Escort IV[®] Transfection Reagent (Merck, Darmstadt, Germany) and 6.5 μ l of 5% glucose solution
202 and incubated 30 min at room temperature. Each cockroach was fed once with 10 μ l of dsRNA lipoplex solution.

203 **qPCR experiments**

204 To evaluate imidacloprid subchronic exposure effect on the expression levels of nAChR subunits and to validate
205 dsRNA targeting α 2 subunit, quantitative PCR (qPCR) experiments were performed on the terminal abdominal
206 ganglia (TAG) of cockroaches. Thus, total RNAs were extracted from TAG removed from nerve cord of control
207 and treated cockroaches using Nucleospin[®] RNA kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to the
208 manufacturer's protocol. After a sodium acetate/ethanol precipitation, 500 ng of purified RNA were reverse

209 transcribed using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis[®] Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,
210 USA). Relative cockroach mRNA subunit expression was quantified by qPCR on CFX Connect[™] Real-Time PCR
211 detection system (Biorad, Hercules, CA, USA) and normalized to the expression level of the housekeeping gene
212 actin used in Benzidane et al. (2017). Primer sets were designed based on the *Periplaneta americana* nAChR
213 subunit sequences published on GenBank database available at NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
214 and the sequences of primers are indicated in Table 1. Each reaction of qPCR was carried out with 5 µl of a 20-
215 fold dilution of cDNA, 0.25 µM of α7 and β1 subunit primer sets or 1 µM of other nAChR subunit primer sets,
216 10 µl of 2X Takyon No Rox SYBR[®] Master Mix Blue dTTP (Eurogentec, Seraing, Belgique). The optimized
217 qPCR programs consisted in initial step at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of denaturation step of 15 s at
218 95°C and a hybridization step of 1 min at 65°C (α7 and β1 subunit primer sets) or 60°C (other nAChR subunit
219 primer sets). The efficiency of each qPCR amplification for gene- specific primers remained between 98% and
220 102% and all qPCR experiments were performed in duplicate. Relative mRNA expression levels of nAChR
221 subunits were determined according to the 2^{-ΔΔCt} method (Pfaffl 2001).

222 **Statistical analysis**

223 For acute intoxication of imidacloprid at LD₁₀, LD₅₀ and LD₉₀, enzymatic activities and qPCR experiments,
224 statistical analysis were performed with nonparametric Mann-Whitney test (p<0.05) using GraphPad Prism version
225 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). In these cases, statistical analysis were considered as significant
226 for * p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 and **** p<0.0001.

227

228 **Results**

229 **Mortality rate after an acute intoxication to imidacloprid.**

230 Cockroaches were treated individually by ingestion of sucrose solution containing the different doses of
231 imidacloprid and the mortality rate was evaluated at 48 h (n = 30 to 90 cockroaches for each dose). Imidacloprid
232 induced dose-dependent mortality at doses ranging from 0.05 µg to 20 µg per cockroach (Fig. 1). According to the
233 mortality curve, we determined the lethal dose 10 (LD₁₀), lethal dose 50 (LD₅₀) and lethal dose 90 (LD₉₀) equal
234 respectively to 0.5 µg, 2.5 µg and 10 µg per cockroach. The aim of our study is to determine the effect of an
235 exposure to a sublethal dose of imidacloprid. In accordance with the work of Benzidane et al. (2017) and our
236 mortality curve, the dose of 0.025 µg was chosen as the sublethal dose for the subchronic exposure experiments.
237 In our experiments, no mortality was observed on cockroaches exposed during 30 days at this dose.

238

239 **Effect of subchronic exposure to a sublethal dose of imidacloprid on the sensitivity of the cockroaches to**
240 **this insecticide.**

241 First of all, the impact of an exposure to the sublethal dose of imidacloprid during 30 days was assessed on the
242 mortality of the cockroaches. Exposed and control cockroaches were treated with an acute dose of imidacloprid
243 corresponding to LD₁₀, LD₅₀ or LD₉₀ and the mortality rate was determined 48 h after their intoxication (Fig. 2a).
244 When the mortality rate of the control group and the exposed group was compared, a significant decreased of this
245 rate was observed for all the tested doses ($p < 0.05$). No acute toxicity was observed anymore at LD₁₀ on the exposed
246 cockroaches and a decreased mortality rates by 59% at the LD₅₀ and 31% at the LD₉₀ compared to the control
247 group were registered. The mortality rate was at LD₅₀ of $22.5 \pm 2.5\%$ instead of $55 \pm 5\%$ for the control group and
248 at LD₉₀ of $60 \pm 4.1\%$ instead of $87.5 \pm 4.8\%$ for the control group ($n = 4$ experiments with 10 cockroaches for each
249 dose). These results indicate that cockroaches exposed to a sublethal dose of imidacloprid during 30 days present
250 a decrease sensitivity to imidacloprid. To determine if this effect is maintained overtime, the same experiments
251 were performed on cockroaches exposed to imidacloprid during 30 days and then kept another 30 days without
252 imidacloprid. In this set of experiments, we demonstrated that the mortality rate of exposed cockroaches was still
253 decreased compared to the control group (Fig. 2b). Indeed, mortality rates of exposed cockroaches were
254 significantly decreased by 68%, 55% and 33% at LD₁₀, LD₅₀ and LD₉₀ respectively (from $12.3 \pm 3.5\%$ for the
255 control group to $4.75 \pm 2.75\%$ for the exposed group at LD₁₀, $p < 0.01$; from $52.2 \pm 2.3\%$ to $25.2 \pm 3.2\%$ at LD₅₀,
256 $p < 0.05$ and from $92.9 \pm 1.9\%$ to $74.8 \pm 4.9\%$ at LD₉₀, $p < 0.01$; $n = 4$ to 8 experiments with 10 to 15 cockroaches
257 for each dose). Thus, after an exposure during 30 days to a sublethal dose of imidacloprid, cockroaches become
258 less sensitive to imidacloprid and this phenomenon persist at least 30 days even if cockroaches were not exposed
259 anymore to the insecticide. To go further, we investigated the cellular and molecular changes induced by this
260 exposure to imidacloprid leading to a decreased sensitivity of the cockroaches to this insecticide. As a decreased
261 sensitivity to insecticides can occur through different mechanisms and since changes to detoxification pathways
262 as well as molecular targets of the insecticides are two of the most common ways, we focused our studies on
263 detoxification enzymes (GST and CE) and nAChRs.

264

265 **Effect of subchronic exposure to a sublethal dose of imidacloprid on the activity of detoxification enzymes.**

266 The GST activity of exposed cockroaches was only 1.11 and 1.28 times higher than control cockroaches at 30 days
267 (Fig. 3a) and 60 days (Fig. 3b) respectively, even if these differences were significant ($p < 0.01$ and $p < 0.0001$,
268 respectively). Indeed, just after intoxication control group had a mean of GST activity of 483.5 ± 10.3 mU/min/mg

269 prot (n = 71) against 538.2 ± 14.1 mU/min/mg prot (n = 62) for exposed cockroaches. At 60 days, control group
270 had a mean of GST activity of 337 ± 7.8 mU/min/mg prot (n = 63) against 432.8 ± 12.5 mU/min/mg prot (n = 59)
271 for exposed cockroaches. In a same way as GST, CE activity has been measured (Fig. 4). At 30 days, no statistical
272 difference between control and exposed cockroaches was observed (Fig. 4a). However, at 60 days, a slight
273 significant difference could be mentionned between the 2 groups. CE activity of exposed cockroaches was
274 increased of 1.1-fold compared to control cockroaches with a mean of CE activity of 36.7 and 31.5 nmol of α -
275 Naphtol/min/mg prot respectively ($p < 0.0001$) (Fig. 4b). By contrast to GST, CE were not involved in both
276 sublethal imidacloprid intoxication phase and resting period.

277

278 **Key role of $\alpha 2$ nicotinic subunit in the sensitivity of the cockroach to imidacloprid**

279 Nicotinic receptors are targets of imidacloprid and some nicotinic subunit expression can be altered after an
280 exposure to a sublethal dose of this insecticide (Benzidane et al. 2017). Indeed, in this previous study (Benzidane
281 et al. 2017), using the same exposure protocol, we demonstrated that $\alpha 2$ subunit expression was decreased. To
282 determine if the decrease of the sensitivity to imidacloprid was linked to the $\alpha 2$ subunit, qPCR experiments were
283 performed on the terminal abdominal ganglia of exposed cockroaches during 30 days and of cockroaches kept
284 another 30 days without imidacloprid treatment (Fig. 5). After subchronic exposure, the expression of $\alpha 2$ mRNA
285 was significantly decreased by approximately 63% compared to the control group ($p < 0.01$, n = 5 to 6 experiments
286 with 6 samples per experiment) (Fig. 5a). Interestingly, at 60 days, 30 days after the end of imidacloprid exposure,
287 expression of $\alpha 2$ mRNA was still decreased by 31% ($p < 0.05$, n = 5 to 9 experiments with 6 samples per
288 experiment) (Fig. 5b).

289 To investigate further this putative involvement of $\alpha 2$ subunit in imidacloprid sensitivity, we have conducted RNAi
290 experiments targeting this subunit. The first step was to confirm that $\alpha 2$ dsRNAs were able to decrease specifically
291 $\alpha 2$ mRNA expression. Control dsRNA have been designed from bacterial gene *LacZ* which was not express in
292 cockroaches. dsRNAs were encapsulated with a cationic liposome carrier to form dsRNA lipoplexes. 96 h after a
293 unique ingestion of dsRNA lipoplexes containing either *LacZ* dsRNA (control group) or $\alpha 2$ dsRNA, expression
294 level of $\alpha 2$ mRNA was measured in the terminal abdominal ganglia of cockroaches. Ingestion of $\alpha 2$ dsRNA
295 lipoplexes decreased significantly by 24% its mRNA expression compared to the control group ($p < 0.05$, n = 7 to
296 8 experiments with 6 samples per experiment) (Fig. 6a). Moreover, this treatment didn't modify significantly the
297 expression of the other known nicotinic subunit mRNA (data not shown). Our results previously described shown
298 that subchronic exposure to a sublethal dose of imidacloprid decreased the expression of $\alpha 2$ subunit mRNA and

299 reduced the sensitivity of cockroaches to this insecticide. Thus, to determine if the $\alpha 2$ subunit played a key role in
300 the imidacloprid sensitivity, we performed an acute intoxication of control and $\alpha 2$ dsRNA treated cockroaches
301 using 2 different doses of imidacloprid (LD_{50} and LD_{90}) (Fig. 6b). The percentage of mortality of cockroaches
302 treated with dsRNA targeting $\alpha 2$ nicotinic subunit was of $22 \pm 2.1\%$ instead of $48.8 \pm 5.6\%$ for the control group
303 at LD_{50} and of $60 \pm 5.5\%$ instead of $86 \pm 4\%$ for the control group at LD_{90} . These results demonstrated that
304 disruption of $\alpha 2$ nicotinic subunit induced a decrease of imidacloprid sensitivity ($p < 0.05$, $n = 5$ experiments with
305 10 to 12 cockroaches per experiment). Thus, ingestion of lipoplexe containing dsRNA targeting $\alpha 2$ nicotinic
306 subunit mimicked the effect of subchronic exposition to a sublethal dose of imidacloprid.

307

308 **Discussion**

309 In this study, we demonstrated that a chronic exposure to a sublethal dose of imidacloprid is sufficient to decrease
310 the sensitivity of the cockroaches *Periplaneta americana* to imidacloprid. Moreover, this effect is maintained over
311 time even if the cockroaches were no longer fed with imidacloprid. Thus, for the first time, we shown that the
312 cockroaches are able to adapt to their toxic environment in order to cope with a subsequent stressor such as a future
313 exposure to the same insecticide. As it is hypothesized that exposure to low doses of insecticides could increase
314 mutations that confer insecticide resistance (Guedes et al. 2017), it is crucial to understand physiological
315 mechanisms induced by an exposure to a sublethal dose of insecticide so that develop sustainable insect resistance
316 management strategies. In the literature, most studies relate the resistance mechanisms induced by intensive use
317 of insecticide (Ffrench-Constant 2013; Ffrench-Constant et al. 2016; Zalucki and Furlong 2017; Balabanidou et
318 al. 2018; Pavlidi et al. 2018) but few studies are devoted to mechanisms elicited by a sublethal dose of insecticides
319 (Bantz et al. 2018). In insects, resistance to insecticides is multifactorial but in most cases, enhanced metabolic
320 detoxification and target alteration are responsible to this phenomenon (Ffrench-Constant 2013; Crossthwaite et
321 al. 2014; Bass et al. 2015; Matsuda et al. 2020). In our work, we evaluated at first the activity of carboxylesterases
322 (CE) and Glutathione S-transferase (GST) in exposed cockroaches. Enzymatic assays were designed to assess
323 these two major classes of detoxification enzymes studied to characterize resistant insects (Hemingway et al. 2004;
324 Daborn et al. 2012; Romero and Anderson 2016; Bass and Jones 2018; Pavlidi et al. 2018; Navarro-Roldán et al.
325 2020). In our study, we demonstrate that after an exposure to the sublethal dose of imidacloprid during 30 days,
326 only the activity of GST slightly increased, no modification of CE activity was found in our conditions.
327 Nevertheless, after 30 days of rest, the activity of both detoxification enzymes slightly increased by a factor of
328 approximately 1.2. If we compare our results with those obtained on resistant insects, we cannot affirm that these

329 metabolic changes are the main mechanism inducing the adaptation of the exposed cockroaches to imidacloprid.
330 Indeed, several studies made on neonicotinoid resistant insects reported that the activity of these enzymes was
331 enhanced at least 2.5 times (Wang et al. 2002; Feng et al. 2010; Yang et al. 2016; Ma et al. 2017). Moreover, we
332 found that the activity of both enzymes was mainly modified 30 days after the imidacloprid exposure, in other
333 words, in absence of imidacloprid. According to these results, we suggest that the weak modifications of GST and
334 CE activity that we observed on exposed cockroaches to a sublethal dose of imidacloprid could participate at the
335 adaptation of the cockroaches but they can't be considered at the main mechanism leading to this phenomenon.
336 Then, the second part of our work was focused on the molecular target of the imidacloprid which are the nAChRs
337 (Matsuda et al. 2020). In a previous study, it has been reported that the same exposure to imidacloprid decreased
338 the expression of the nicotinic $\alpha 2$ subunit (Benzidane et al. 2017). In our experiments, we also shown that the
339 quantity of nicotinic $\alpha 2$ mRNA was diminished after 30-day exposure to a sublethal dose of imidacloprid but we
340 demonstrated as well as that a decrease of nicotinic $\alpha 2$ mRNA was maintained after 30 days of rest. If we analysed
341 these results with our toxicological data, we suggest that the nicotinic $\alpha 2$ subunit could play a key role in the
342 sensitivity of the cockroaches to imidacloprid. To confirm our hypothesis, we used RNAi targeting nicotinic $\alpha 2$
343 subunit. Using toxicological test, we determined that cockroaches treated with dsRNA $\alpha 2$ are less sensitive to
344 acute imidacloprid intoxication than control cockroaches. Indeed, at the dose inducing 50% of the mortality of the
345 control cockroaches, only around 20% of the treated dsRNA $\alpha 2$ cockroaches were killed. Moreover, a decrease in
346 the mortality rate was also observed at the LD₉₀ value. These results are similar to those obtained after a subchronic
347 exposure to a sublethal dose of imidacloprid. Thus, we can conclude that nicotinic $\alpha 2$ subunit play a major role in
348 the sensitivity change of the cockroaches with respect to imidacloprid. According to the literature, decrease of
349 imidacloprid sensitivity correlated to nAChRs is often linked in insects to target-site mutations (Bass et al. 2015;
350 Matsuda et al. 2020). Sequencing of nAChR subunit genes from insect resistant to imidacloprid led to the
351 identification of different point-mutations. In the green peach aphid *Myzus persicae* and in the cotton aphid *Aphis*
352 *gossypii*, a substitution of an arginine to threonine was observed at the 81 position in the loop D of the nicotinic
353 $\beta 1$ subunit (Bass et al. 2011; Hirata et al. 2015). The loop D is known to play a role in the binding of neonicotinoïds
354 (Matsuda et al. 2020). In the brown planthopper *Nilaparvata lugens*, a single point mutation at a conserved position
355 (Y151S) in two α nAChRs subunits, N1 α 1 and N1 α 3 was attributed to imidacloprid resistance (Liu et al. 2005,
356 2006). However, more recently, Zhang and colleagues (2015) demonstrated that the reduction of nicotinic $\alpha 8$
357 subunit expression affected the sensitivity of *N. lugens* to imidacloprid. Thus, quantitative changes in insecticide
358 targets could also lead to decreased sensitivity to insecticides. However, in the case of *N. lugens*, $\alpha 8$ subunit

359 belongs to a nAChRs having a high-affinity binding site for imidacloprid (Li et al. 2010). In cockroaches
360 *Periplaneta americana*, the $\alpha 2$ subunits are combined with $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits to form the nAChR2 subtype (Sun
361 et al. 2017) and the nAChR2 is insensitive to imidacloprid (Courjaret and Lapied 2001; Sun et al. 2017; Benzidane
362 et al. 2017). However, in a previous study, it has been shown that DUM neurons coming from cockroaches exposed
363 to the same sublethal dose of imidacloprid during 30 days and showing a decrease of $\alpha 2$ mRNA expression are
364 less sensitive to application of imidacloprid but are able to optimize functional properties of nAChR2 (Benzidane
365 et al. 2017). The authors suggested that intracellular signalling calcium-dependent pathways could regulate
366 nAChR2 function. Indeed, different cellular and molecular factors including calcium-dependent signalling
367 pathways modulate the sensitivity of nAChR2 to neonicotinoid insecticides (Bodereau et al. 2012; Calas-List et
368 al. 2013; Mannai et al. 2016). However, it wasn't demonstrated if the nAChR2 subtype from exposed cockroaches
369 are made of the same nicotinic subunits that those from unexposed cockroaches. Further studies are needed to
370 determine how a decrease of $\alpha 2$ subunit expression could contribute to optimize the function of nAChR2 subtype
371 to maintain physiological functions. This work which brings knowledge on the role of nicotinic $\alpha 2$ subunit in
372 imidacloprid sensitivity could help to understand how insects deal with exposure to sublethal dose of imidacloprid
373 in order to circumvent its effect and to develop new strategies to improve pest control.

374

375 **References**

376 Balabanidou V, Grigoraki L, Vontas J (2018) Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Curr*
377 *Opin Insect Sci* 27:68-74. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.03.001>

378

379 Bantz A, Camon J, Froger JA, Goven D, Raymond V (2018) Exposure to sublethal doses of insecticide and their
380 effects on insects at cellular and physiological levels. *Curr Opin Insect Sci* 30:73-78.
381 <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.09.008>

382

383 Bass C, Puinean AM, Andrews M, Cutler P, Daniels M, Elias J, Paul VL, Crossthwaite AJ, Denholm I, Field LM,
384 Foster SP, Lind R, Williamson MS, Slater R (2011) Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is
385 associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neurosci* 12:51.
386 <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-51>

387

388 Bass C, Denholm I, Williamson MS, Nauen R (2015) The global status of insect resistance to neonicotinoid
389 insecticides. *Pestic Biochem Physiol* 121:78-87. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>
390

391 Bass C, Jones CM (2018) Editorial overview: Pests and resistance: Resistance to pesticides in arthropod crop pests
392 and disease vectors: mechanisms, models and tools. *Curr Opin Insect Sci* 27:iv-vii.
393 <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.009>
394

395 Benzidane Y, Goven D, Abd-Ella AA, Deshayes C, Lapied B, Raymond V (2017) Subchronic exposure to
396 sublethal dose of imidacloprid changes electrophysiological properties and expression pattern of nicotinic
397 acetylcholine receptor subtypes in insect neurosecretory cells. *Neurotoxicology* 62:239-247.
398 <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.08.001>
399

400 Bodereau-Dubois B, List O, Calas-List D, Marques O, Communal PY, Thany SH, Lapied B (2012)
401 Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity
402 of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides. *J*
403 *Pharmacol Exp Ther* 341:326-339. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.188060>
404

405 Bonmatin JM, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreuzweiser DP, Krupke C, Liess M, Long E, Marzaro M,
406 Mitchell EA, Noome DA, Simon-Delso N, Tapparo A (2015) Environmental fate and exposure; neonicotinoids
407 and fipronil. *Environ Sci Pollut Res Int* 22:35-67. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>
408

409 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing
410 the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
411

412 Calas-List D, List O, Quinchard S, Thany SH (2013) Calcium pathways such as cAMP modulate clothianidin
413 action through activation of α -bungarotoxin-sensitive and -insensitive nicotinic acetylcholine receptors.
414 *Neurotoxicology* 37:127-133. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.04.011>
415

416 Casida JE, Durkin KA (2013) Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu*
417 *Rev Entomol* 58:99-117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>

418

419 Catae AF, Roat TC, Pratavieira M, Silva Menegasso ARD, Palma MS, Malaspina O (2018) Exposure to a sublethal
420 concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera,
421 Apidae). *Ecotoxicology* 27:109-121. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1874-4>

422

423 Courjaret R, Lapied B (2001) Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-
424 bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired
425 median neurons). *Mol Pharmacol* 60:80-91.

426

427 Crossthwaite AJ, Rendine S, Stenta M, Slater R (2014) Target-site resistance to neonicotinoids. *J Chem Biol* 7:125-
428 128. <https://doi:10.1007/s12154-014-0116-y>

429

430 Daborn PJ, Lumb C, Harrop TW, Blasetti A, Pasricha S, Morin S, Mitchell SN, Donnelly MJ, Müller P, Batterham
431 P (2012) Using *Drosophila melanogaster* to validate metabolism-based insecticide resistance from insect pests.
432 *Insect Biochem Mol Biol* 42:918-924. <https://doi:10.1016/j.ibmb.2012.09.003>

433

434 Feltham H, Park K, Goulson D (2014) Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen
435 foraging efficiency. *Ecotoxicology* 23:317-323. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1189-7>

436

437 Feng Y, Wu Q, Wang S, Chang X, Xie W, Xu B, Zhang Y (2010) Cross-resistance study and biochemical
438 mechanisms of thiamethoxam resistance in B-biotype *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag Sci*
439 66:313-318. <https://doi:10.1002/ps.1877>

440

441 Ffrench-Constant RH (2013) The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics* 194:807-815.
442 <https://doi.org/10.1534/genetics.112.141895>

443

444 Ffrench-Constant RH, Williamson MS, Davies TG, Bass C (2016) Ion channels as insecticide targets. *J Neurogenet*
445 30:163-177. <https://doi.org/10.1080/01677063.2016.1229781>

446

447 Guedes RNC, Walse SS, Throne JE (2017) Sublethal exposure, insecticide resistance, and community stress. *Curr*
448 *Opin Insect Sci* 21:47-53. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.010>
449

450 Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in
451 mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34:653-665. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.03.018>
452

453 Hirata K, Kiyota R, Matsuura A, Toda S, Yamamoto A, Iwasa T (2015) Association between the R81T mutation
454 in the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit of *Aphis gossypii* and the differential resistance to acetamiprid
455 and imidacloprid. *J Pestic Sci* 40:25-31. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D14-092>
456

457 Ihara M, Matsuda K (2018) Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact
458 on pollinators. *Curr Opin Insect Sci* 30:86-92. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.09.009>
459

460 Lalouette L, Pottier MA, Wycke MA, Boitard C, Bozzolan F, Maria A, Demondion E, Chertemps T, Lucas P,
461 Renault D, Maibeche M, Siaussat D (2016) Unexpected effects of sublethal doses of insecticide on the peripheral
462 olfactory response and sexual behavior in a pest insect. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:3073-3085.
463 <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5923-3>
464

465 Li J, Shao Y, Ding Z, Bao H, Liu Z, Han Z, Millar NS (2010) Native subunit composition of two insect nicotinic
466 receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. *Insect Biochem Mol Biol* 40:17-22.
467 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.12.003>
468

469 Lin YH, Huang JH, Liu Y, Belles X, Lee HJ (2017) Oral delivery of dsRNA lipoplexes to German cockroach
470 protects dsRNA from degradation and induces RNAi response. *Pest Manag Sci* 73:960-966.
471 <https://doi.org/10.1002/ps.4407>
472

473 Liu Z, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han Z, Millar NS (2005) A nicotinic acetylcholine receptor
474 mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc Natl*
475 *Acad Sci U S A* 102:8420-8425. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502901102>
476

477 Liu Z, Williamson MS, Lansdell SJ, Han Z, Denholm I, Millar NS (2006) A nicotinic acetylcholine receptor
478 mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoid insecticides. *J Neurochem* 99:1273-
479 1281. <https://doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04167.x>
480

481 Ma Z, Li J, Zhang Y, Shan C, Gao X (2017) Inheritance mode and mechanisms of resistance to imidacloprid in
482 the house fly *Musca domestica* (Diptera:Muscidae) from China. *PLoS One* 12:e0189343.
483 <https://doi:10.1371/journal.pone.0189343>
484

485 Mannai S, Bitri L, Thany SH (2016) cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway modulates nicotine-induced
486 currents through the activation of α -bungarotoxin-insensitive nicotinic acetylcholine receptors from insect
487 neurosecretory cells. *J Neurochem* 137:931-938. <https://doi:10.1111/jnc.13633>
488

489 Matsuda K, Ihara M, Sattelle DB (2020) Neonicotinoid Insecticides: Molecular Targets, Resistance, and Toxicity.
490 *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 60:241-255. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021747>
491

492 Nauen R, Stumpf N (2002) Fluorometric microplate assay to measure glutathione S-transferase activity in insects
493 and mites using monochlorobimane. *Anal Biochem* 303:194-198. <https://doi:10.1006/abio.2002.5578>
494

495 Navarro-Roldán MA, Bosch D, Gemeno C, Siegwart M (2020) Enzymatic detoxification strategies for neurotoxic
496 insecticides in adults of three tortricid pests. *Bull Entomol Res* 110:144-154.
497 <https://doi:10.1017/S0007485319000415>
498

499 Pavlidi N, Vontas J, Van Leeuwen T (2018) The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance
500 in crop pests and disease vectors. *Curr Opin Insect Sci* 27:97-102. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.007>
501

502 Pelhate M, Pichon Y, Beadle DJ (1990) Cockroach axons and cell bodies: electrical activity. In: Huber I, Masler
503 EP, Rao BR (eds) *Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research*, 1st Edn. CRC
504 Press Boca Raton, pp. 131-148
505

506 Pfaffl M W (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*
507 29:e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
508

509 Raymond V, Goven D, Benzidane Y, List O, Lapied B (2017) Influence of Cellular and Molecular Factors on
510 Membrane Target Sensitivity to Insecticides. *Curr Med Chem* 24:2974-2987.
511 <https://doi.org/10.2174/0929867324666170316111315>
512

513 Reyes M, Franck P, Charmillot PJ, Ioriatti C, Olivares J, Pasqualini E, Sauphanor B (2007) Diversity of insecticide
514 resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Manag*
515 *Sci* 63:890-902. <https://doi:10.1002/ps.1421>
516

517 Rix RR, Ayyanath MM, Cutler GC (2016) Sublethal concentrations of imidacloprid increase reproduction, alter
518 expression of detoxification genes, and prime *Myzus persicae* for subsequent stress. *J Pest Sci* 89:581–589.
519 <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0716-5>
520

521 Romero A, Anderson TD (2016) High Levels of Resistance in the Common Bed Bug, *Cimex lectularius*
522 (Hemiptera: Cimicidae), to Neonicotinoid Insecticides. *J Med Entomol* 53:727-731.
523 <https://doi:10.1093/jme/tjv253>
524

525 Siegwart M, Thibord JB, Olivares J, Hirn C, Elias J, Maugin S, Lavigne C (2017) Biochemical and Molecular
526 Mechanisms Associated With the Resistance of the European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Lambda-
527 Cyhalothrin and First Monitoring Tool. *J Econ Entomol* 110:598-606. <https://doi.org/10.1093/jee/tow267>
528

529 Sun H, Liu Y, Li J, Cang X, Bao H, Liu Z (2017) The potential subunits involved in two subtypes of α -Bgt-resistant
530 nAChRs in cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons. *Insect Biochem Mol Biol* 81:32-40.
531 <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.11.009>
532

533 Tison L, Rößner A, Gerschewski S, Menzel R (2019) The neonicotinoid clothianidin impairs memory processing
534 in honey bees. *Ecotoxicol Environ Saf* 180:139-145. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.007>
535

536 Vryzas Z (2018) Pesticide fate in soil-sediment-water environment in relation to contamination preventing actions.
537 Curr Opin Environ Sci Health 4:5-9. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2018.03.001>.
538
539 Wang KY, Liu TX, Yu CH, Jiang XY, Yi MQ (2002) Resistance of *aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to
540 fenvalerate and imidacloprid and activities of detoxification enzymes on cotton and cucumber. J Econ Entomol
541 95:407-413. <https://doi:10.1603/0022-0493-95.2.407>
542
543 Yang X, He C, Xie W, Liu Y, Xia J, Yang Z, Guo L, Wen Y, Wang S, Wu Q, Yang F, Zhou X, Zhang Y (2016)
544 Glutathione S-transferases are involved in thiamethoxam resistance in the field whitefly *Bemisia tabaci* Q
545 (Hemiptera: Aleyrodidae). Pestic Biochem Physiol 134:73-78. <https://doi:10.1016/j.pestbp.2016.04.003>
546
547 Zalucki MP, Furlong MJ (2017) Behavior as a mechanism of insecticide resistance: evaluation of the evidence.
548 Curr Opin Insect Sci 21:19-25. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.006>
549
550 Zhang Y, Wang X, Yang B, Hu Y, Huang L, Bass C, Liu Z (2015) Reduction in mRNA and protein expression of
551 a nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 8$ subunit is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper,
552 *Nilaparvata lugens*. J Neurochem 135:686-694. <https://doi.org/10.1111/jnc.13281>
553
554 Zhao Y, Wang Q, Ding J, Wang Y, Zhang Z, Liu F, Mu W (2018) Sublethal effects of chlorfenapyr on the life
555 table parameters, nutritional physiology and enzymatic properties of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae).
556 Pestic Biochem Physiol 148:93-102. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.003>
557

558 **Figure legends**

559 **Fig. 1** Mortality rate of adult male cockroaches evaluated 48 h after acute intoxication using imidacloprid doses
560 ranging from 0.01 μg to 20 μg per cockroach. Between 30 to 90 cockroaches were used for each tested dose. LD₁₀,
561 LD₅₀ and LD₉₀ represent the dose inducing 10%, 50% and 90% of mortality respectively. Data are means \pm S.E.M.
562
563 **Fig. 2 (a)** Histograms showing mortality rates observed at 48 h in control and exposed cockroaches to sublethal
564 dose of imidacloprid during 30 days. Control mortality rates are expressed as means \pm S.E.M. (n = 4 experiments
565 with 10 cockroaches per experiment ; * p<0,05, Mann-Whitney Test). **(b)** Histograms showing mortality rates

566 observed at 48 h in control and exposed cockroaches to a sublethal dose of imidacloprid during 30 days followed
567 by 30 resting days without insecticide (n = 4 to 8 experiments with 10 to 15 cockroaches per experiment; * p<0.05;
568 ** p<0.01, Mann-Whitney Test)

569

570 **Fig. 3 (a)** Effect of 30-day exposure to a sublethal dose of imidacloprid on Glutathione S-Transferase (GST)
571 activity (mU/min/mg protein). Box-and-whisker plot indicate the median, the 25th and the 75th percentiles (box
572 edges) and the range (whiskers) (n = 71 cockroaches for the control experiment whereas for the exposed cockroach
573 group n = 62 cockroaches, ** p<0.01, Mann-Withney test). **(b)** GST activity on the 60th day. Control group
574 included 63 cockroaches and the exposed group 59 cockroaches (**** p<0.0001 with Mann-Whitney test)

575

576 **Fig. 4 (a)** Effect of 30-day exposure to a sublethal dose of imidacloprid on carboxylesterase activity (nmol of α -
577 naphthol/min/mg of extracted protein). Box-and-whisker plots indicate the median, the 25th and the 75th percentiles
578 (box edges) and the range (whiskers) (n = 71 cockroaches for the control experiment whereas for the exposed
579 cockroach group n = 62 cockroaches, ns p>0.05 with Mann-Withney test). **(b)** Carboxylesterase activity on the
580 60th day. Control group included 63 cockroaches and the exposed group 59 cockroaches (**** p<0.0001 with
581 Mann-Whitney test)

582

583 **Fig. 5** Comparative histograms illustrating the expression level of $\alpha 2$ mRNA nicotinic subunit after a 30-day
584 exposure to a sublethal dose of imidacloprid **(a)** followed by 30 resting days **(b)**. Quantitative PCR experiments
585 were performed on the terminal abdominal ganglia of control and exposed cockroaches. Results are represented
586 as the mean \pm S.E.M. of 5 to 9 independent experiments with 6 samples per experiment. Data were normalized to
587 the expression of the housekeeping gene actin. * p<0.05, ** p<0.01 (Mann-Whitney test)

588

589 **Fig. 6 (a)** Effect of dsRNA targeting $\alpha 2$ nicotinic subunit on the expression of $\alpha 2$ mRNA. Quantitative PCR
590 experiments were performed 96 h after dsRNA ingestion on the terminal abdominal ganglia of cockroaches treated
591 with either LacZ dsRNA (control group) or $\alpha 2$ dsRNA (treated group). Results are represented as the mean \pm
592 S.E.M. of 7 to 8 independent experiments with 6 samples per experiment. Data were normalized to the expression
593 of the housekeeping gene actin. * p<0.05 (Mann-Whitney test). **(b)** Effect of $\alpha 2$ dsRNA ingestion on the mortality
594 rate. The experiments were performed on two groups of cockroaches treated with either LacZ dsRNA (control
595 group) or $\alpha 2$ dsRNA (treated group). 96 h after dsRNA ingestion, cockroaches received a single dose of

596 imidacloprid (LD₅₀ or LD₉₀). The mortality rate was then evaluated 48 h after this acute intoxication. Data are
 597 means ± S.E.M. (n = 5 experiments with 10 to 12 cockroaches per experiment; * p<0.05, Mann-Whitney test)

598

599 **Table 1. Sequence of primers used for real-time quantitative PCR experiments**

	N° Accession	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (3'→5')
α1	JQ585634.1	AGGACTCTGTGGAGGACGAG	CTCCCGGTAGAGGCAGTGGT
α2	JQ585635.1	TAACAACCTCCATCTCATGCC	GATCTTGCCACTCATGTTCC
α3	JQ609337.1	CGACACCTTCAGCATTTGTG	GCAGATGAACCCGCTAGACT
α4	JN390946.1	GTGTTGATGCGTACAGTGAG	AGACAGGTCATCCTTTGTAG
α6	JF731243.1	TGACCATCTTGCTCTCGT	CGACTCATTCCGAGAATC
α7	JF731242.1	CAATTGCAAGACGACACC	ATGGAGGCGATGAGAACA
α8	JN390947.1	ACGTGTTGTCCGCACTTCA	TATCCGGAGGAACCTGGAAG
β1	JN390948.2	GGTGACCAAGTGCCTTAG	ATGATTGCCCTCGTAGATG
actin	AY116670.1	GACTACTGGTATTGTGCTGG	AAAGCTGTAACCCAGCTCAG

600

Fig. 1

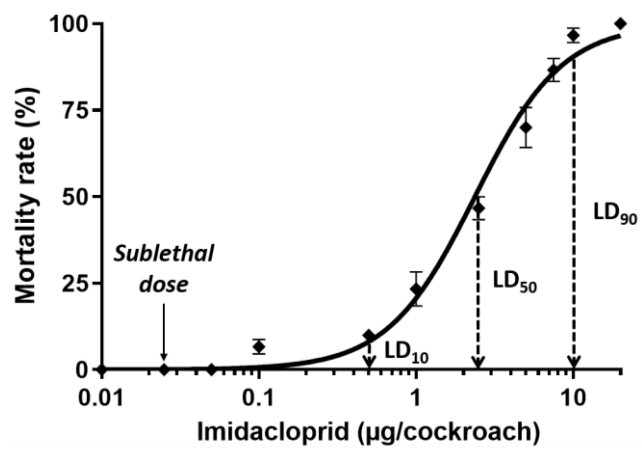


Fig. 2

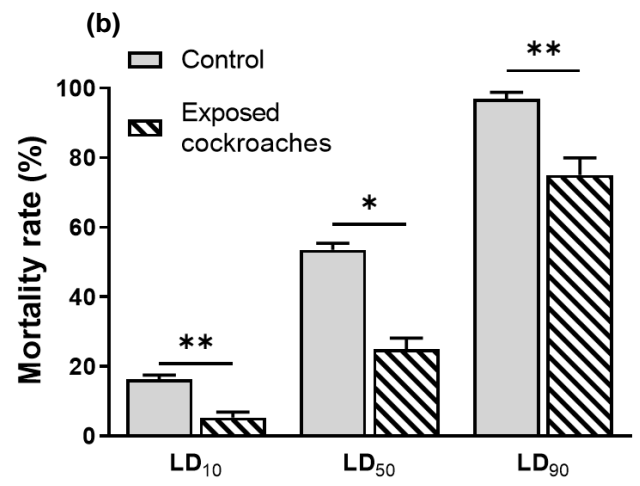
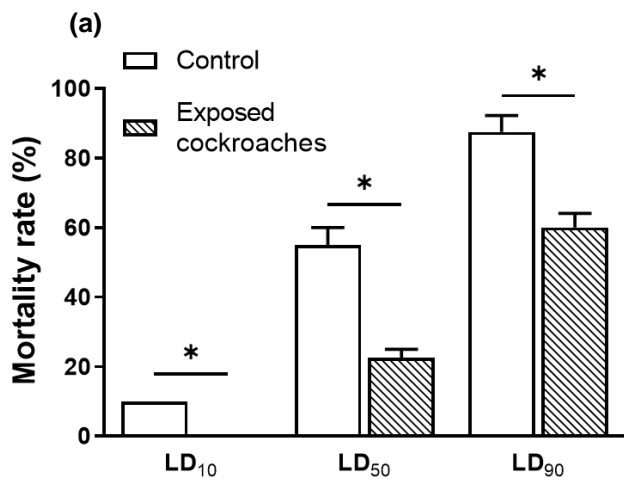


Fig. 3

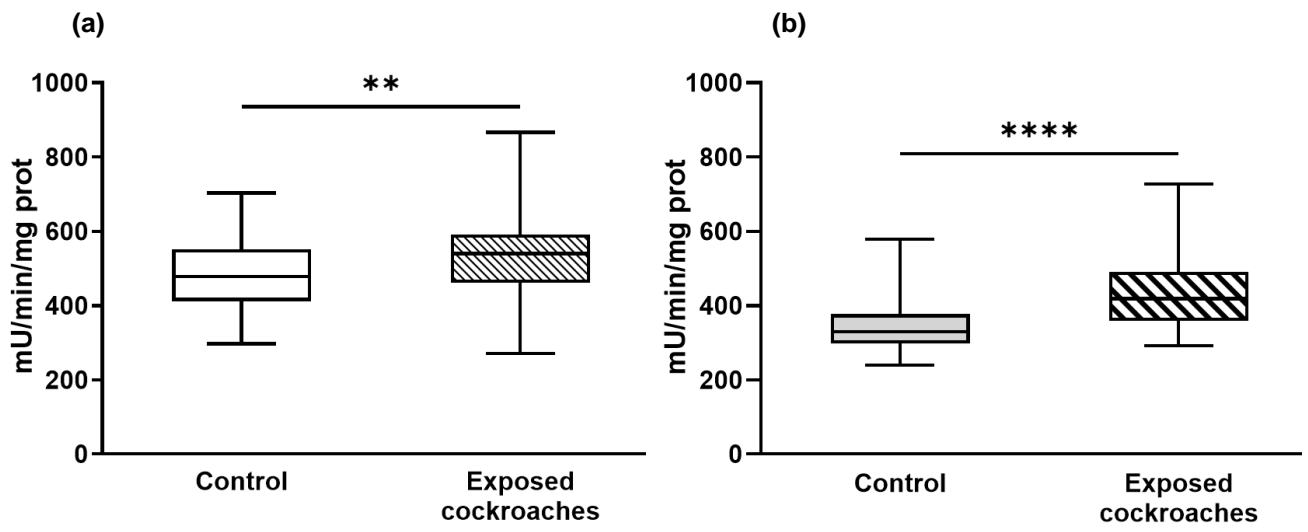


Fig. 4

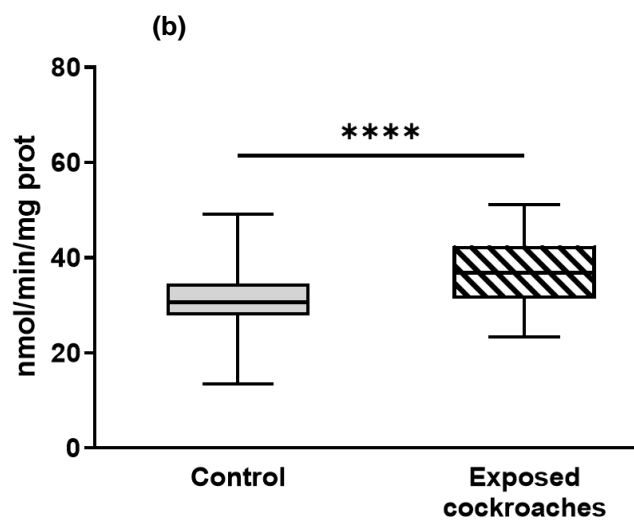
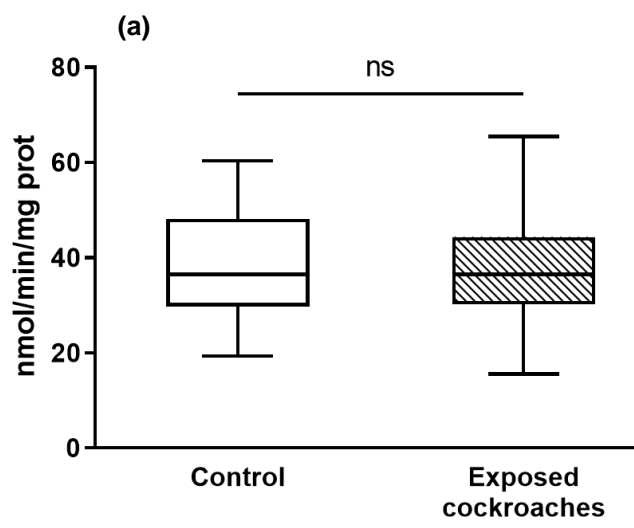


Fig. 5

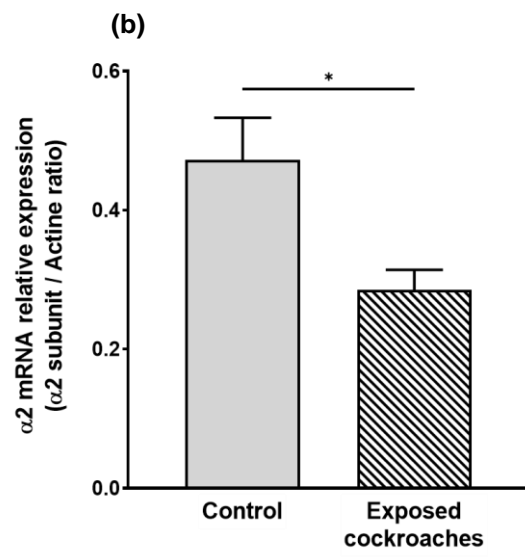
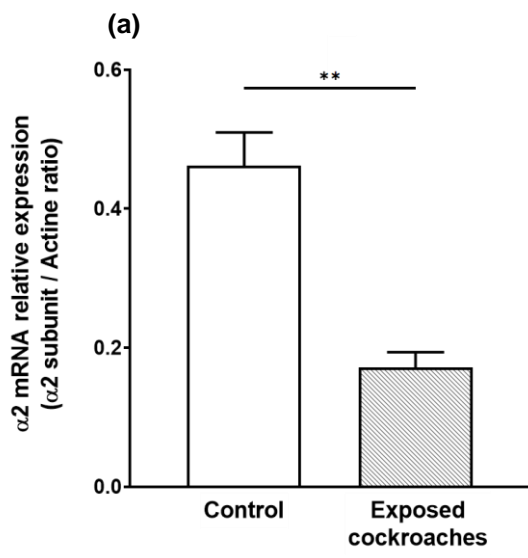
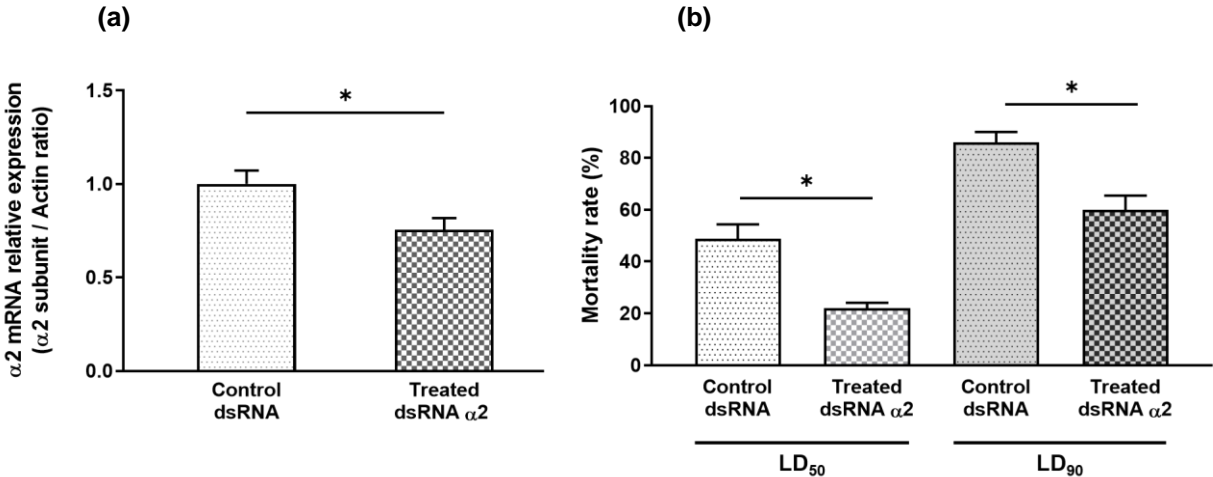


Fig. 6



Étude 4 : Utilisation des ARN interférents dirigés contre la sous-unité $\beta 1$ pour contourner les mécanismes d'acclimatation mis en place par la blatte *P. americana* suite à une exposition à une dose sublétales d'Imidaclopride

7. Contexte et objectifs de l'étude

L'agriculture contemporaine fait face à un important défi qui est d'assurer une production de qualité capable de répondre à l'ensemble des besoins alimentaires de la population mondiale en perpétuelle croissance. Dans ce cadre, l'utilisation des produits phytosanitaires tels que les insecticides a permis d'accomplir de nombreux progrès en matière de rendements agricoles et de protection des cultures. Cependant, plusieurs de ces molécules sont à l'origine de diverses polémiques concernant leur utilisation et les risques potentiels qu'elles peuvent représenter pour l'environnement et la santé humaine. Ces risques ont amené le gouvernement à mettre en place le plan Ecophyto visant à réduire de 50% l'utilisation des produits phytosanitaires d'ici 2018, objectif repoussé actuellement à 2025 (Ecophyto 2+). En plus de ces risques environnementaux et de santé publique, l'utilisation non raisonnée des insecticides ces dernières décennies a conduit à l'apparition de populations d'insectes résistants entraînant une diminution de l'efficacité des traitements insecticides. Par conséquent, peu de substances chimiques restent actuellement utilisables pour lutter contre les insectes nuisibles, ce qui rend problématique le contrôle de ces insectes. En accord avec le plan Ecophyto 2+, l'agriculture tend aujourd'hui vers une protection agro-écologique des cultures. Cependant, cet objectif ne pourra être atteint que si des méthodes alternatives de lutte sont développées. Une des stratégies prometteuses envisagées passe par l'utilisation d'ARN interférents ciblant un acteur clé dans la physiologie des insectes (Baum et Roberts, 2014; Christiaens et al, 2016; Mamta et Rajam, 2017). Dans cette étude, nous nous intéresserons aux nAChRs qui sont la cible des insecticides de type néonicotinoïde et qui présentent un rôle essentiel dans le SNC des insectes. De plus, l'implication de certaines des sous-unités nicotiniques telles que la sous-unité $\beta 1$ dans des phénomènes de résistance au néonicotinoïde Imidaclopride a été rapportée (Bass et al, 2011; Chen et al, 2017; Hirata et al, 2017; Wang et al, 2018; Shan et al, 2020). Il a également été montré qu'une exposition de la blatte *P. americana* à une dose sublétales d'Imidaclopride entraînait des modifications au niveau des sous-types de nAChRs insensibles à l' α -Bgt, nommés nAChR1 et nAChR2 qui se distinguent selon leurs profils pharmacologiques et leur composition en sous-unités nicotiniques (Benzidane et al, 2017). En effet, seuls les nAChR1 sont sensibles à l'Imidaclopride (Courjaret et Lapied, 2001) et les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 8$ et $\beta 1$ seraient impliquées dans la composition des nAChR1 alors que les sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\beta 1$ participeraient aux nAChR2 (Sun et al, 2017). Parmi les modifications observées, une variation de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ a été rapportée conduisant à des changements dans la composition des sous-types nAChR2 de manière à rendre moins sensible la blatte à l'Imidaclopride. Notre

hypothèse est donc qu'une diminution de l'expression de la sous-unité $\beta 1$ qui entre dans la composition de ces deux sous-types de nAChRs pourrait permettre d'augmenter la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride et ainsi contourner les mécanismes d'acclimatation mis en place par l'insecte lors d'une exposition à une dose sublétalement d'Imidaclopride. Le but de ce travail est donc d'utiliser des ARN interférents ciblant la sous-unité $\beta 1$ pour restaurer la sensibilité des blattes acclimatées au traitement subchronique à l'Imidaclopride. Pour ce faire, après avoir validé par qPCR la diminution de l'expression de la sous-unité $\beta 1$ suite à l'ingestion de lipoplexes contenant des dsRNAs dirigés contre cette sous-unité (dsRNA- $\beta 1$), la sensibilité des blattes exposées à une dose sublétalement d'Imidaclopride (0,025 $\mu\text{g}/\text{jour}/\text{blatte}$) pendant 30 jours sera évaluée à l'aide d'expériences d'intoxication aiguë à l'Imidaclopride (DL_{50}).

8. Résultats

8.1. Effet des dsRNAs sur l'expression des ARNm de la sous-unité $\beta 1$

Afin d'évaluer l'efficacité et la spécificité des dsRNAs- $\beta 1$, la quantification de l'expression des transcrits des différentes sous-unités décrites dans la base de données NCBI ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 8$ et $\beta 1$) a été entreprise par qPCR. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence, 96h post-ingestion, que l'ingestion unique de dsRNA ciblant la sous-unité $\beta 1$ (0,25 $\mu\text{g}/\text{blatte}$) induit une diminution d'environ 23% du niveau d'expression des ARNm codants pour la sous-unité nicotinique $\beta 1$ dans les DGA provenant des blattes ayant ingéré les dsRNAs- $\beta 1$ comparés au groupe témoin (dsRNA-LacZ) (** $p < 0,01$) (Figure 33A). L'expression des transcrits des autres sous-unités nicotiniques n'est pas modifiée (Figure 33B).

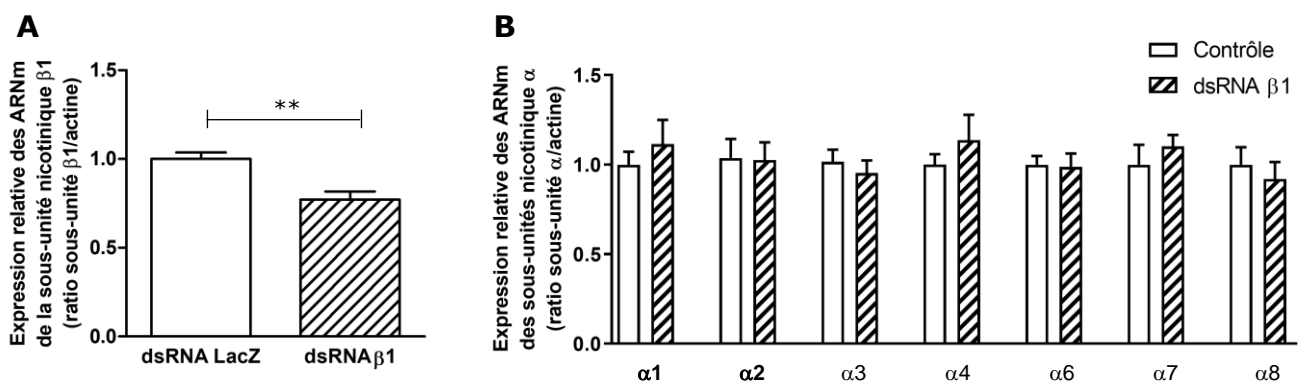


Figure 33. Représentations graphiques de la quantification de l'expression relative des ARNm codants pour la sous-unité nicotinique $\beta 1$ (A) et des sous-unités nicotiniques α (B) dans les DGA provenant de blattes ayant ingéré les dsRNAs-LacZ (groupe témoin) ou les dsRNAs- $\beta 1$. L'expression relative est normalisée avec le gène de l'actine (gène de référence) selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ et les résultats représentent des moyennes \pm S.E.M. (** $p < 0,01$, test de Mann-Whitney ; $n = 8$ comprenant 6 DGA par n).

8.2. Évaluation de l'effet des dsRNAs- β 1 sur la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride

Compte tenu du fait que la composition en sous-unités nicotiques des nAChRs détermine leur sensibilité aux insecticides, la diminution de l'expression des ARNm de la sous-unité β 1 par les dsRNAs- β 1 suggère une modification de la composition des nAChRs conduisant à une variation de l'efficacité de l'insecticide. Ainsi, des blattes acclimatées (I30) ou non (D30) ayant ingéré des dsRNAs témoin (dsRNA-LacZ) ou dirigés contre la sous-unité β 1 (dsRNA- β 1) sont intoxiquées avec de l'Imidaclopride (DL_{50}). 96h après l'intoxication aiguë, une diminution de la mortalité d'environ 30% est observée chez les blattes acclimatées ayant ingéré les dsRNAs-LacZ (dsRNA-LacZ I30) comparées aux blattes témoins (dsRNA-LacZ D30) (* $p < 0,05$; Figure 34). En revanche, aucune différence de mortalité n'est reportée entre les différents groupes de blattes ayant ingéré des dsRNAs dirigés contre la sous-unité β 1 (dsRNA- β 1 D30 vs dsRNA- β 1 I30) (Figure 34). Cependant, une différence significative de mortalité est observée entre les blattes acclimatées ayant ingéré des dsRNAs-LacZ et celles ayant ingéré des dsRNAs dirigés contre la sous-unité β 1 (** $p < 0,01$, dsRNA-LacZ I30 vs dsRNA- β 1 I30). Ainsi, les ARN interférents dirigés contre la sous-unité β 1 permettraient de restaurer un phénotype « sensible » chez les blattes acclimatées de manière à les rendre plus sensibles à l'Imidaclopride.

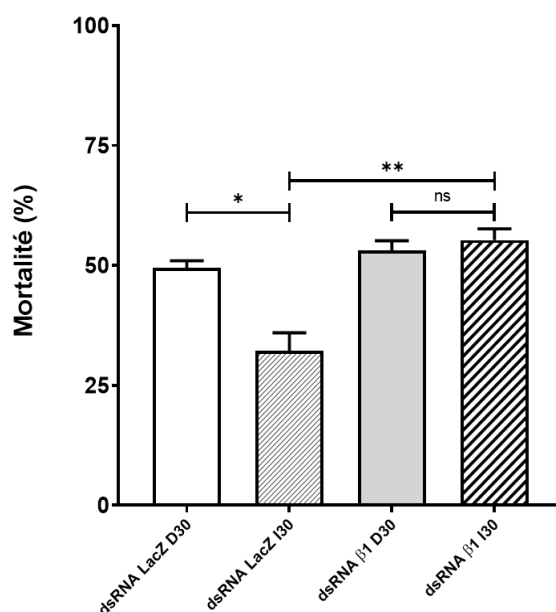


Figure 34. Représentation graphique du taux de mortalité observé suite à une intoxication aiguë à l'Imidaclopride (DL_{50}) chez différents groupes de blattes. Les groupes « dsRNA LacZ I30 » et « dsRNA LacZ D30 » correspondent aux blattes ayant ingéré les dsRNAs ciblant le gène LacZ (témoin) et ayant été exposées ou non à une dose sublétales d'imidaclopride pendant 30 jours respectivement. Les groupes « dsRNA β 1 I30 » et « dsRNA β 1 D30 » correspondent aux blattes ayant ingéré les dsRNAs dirigés contre la sous-unité β 1 et ayant été exposées ou non à une dose sublétales d'imidaclopride pendant 30 jours respectivement. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm S.E.M. et analysés avec le test de Mann-Whitney (ns : non significatif, * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$; $n = 5$ avec 10 à 15 blattes par n).

9. Conclusion

Ces résultats restent prometteurs pour le développement d'une stratégie agro-écologique basée sur l'utilisation des ARN interférents ciblant le système cholinergique comme modulateur de l'efficacité d'un insecticide. Ainsi, l'utilisation des dsRNAs dans la lutte contre les insectes nuisibles permettrait d'optimiser un traitement insecticide qui serait plus spécifique que les molécules actuelles tout en diminuant les doses d'insecticides en accord avec les directives gouvernementales et en contournant les phénomènes de résistance mis en place par l'insecte.

Etude 5 : Analyse par RNAseq des modifications transcriptionnelles induites par l'exposition à une dose sub létale d'Imidaclopride chez la blatte *P. americana*

Pour aller plus loin dans la mise en évidence des modifications cellulaires et moléculaires induites chez la blatte *P. americana* par l'exposition subchronique pendant 30 jours à la dose sub létale d'Imidaclopride, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par RNAseq afin de déterminer les différents facteurs impliqués dans l'acclimatation des blattes. Ces données sont actuellement en cours d'analyse et les résultats préliminaires sont présentés ci-dessous.

1. Quantification des principaux acteurs en lien avec le système cholinergique

Dans la littérature, il a été montré que l'activité des nAChRs pouvait être modulée par de nombreuses protéines telles que les protéines auxiliaires ou bien des kinases et/ou phosphatases impliquées dans différentes voies de signalisation intracellulaire (Thany et al, 2007; Jones et al, 2010; Calas-List et al, 2013; List et al, 2014; Raymond et al, 2017). Ainsi, l'ensemble des sous-unités nicotiques et certaines protéines régulatrices ont été sélectionnés pour notre étude. Ces protéines ont été classées selon leur fonction biologique pour plus de clarté dans l'analyse. De plus, la quantification d'expression de ces différents gènes d'intérêt ainsi que de leurs potentielles isoformes a permis d'établir leur profil d'expression en fonction des conditions expérimentales (D30, I30, D60, I60). Ces profils d'expression sont représentés sous la forme d'une heatmap permettant de visualiser globalement les variations d'expression de ces gènes d'intérêt.

1.1. Les sous-unités nicotiques

A partir des séquences nucléotidiques des sous-unités nicotiques α ($\alpha 1$ à $\alpha 9$) et β ($\beta 1$ et $\beta 10$) déposées dans la banque de données NCBI et identifiées grâce à l'étude 2, nous avons confirmé l'expression de ces sous-unités dans le DGA de la blatte *P. americana* à l'exception des sous-unités $\beta 7$, $\beta 10$ et les 2 isoformes $\alpha 7$ nommées $\alpha 7$ exons 7a/8b et $\alpha 7$ exons 7b/8a. Parmi l'ensemble des sous-unités nicotiques, les sous-unités $\alpha 8$, $\alpha 9$ et $\beta 2$ seraient majoritairement exprimées dans le DGA de la blatte (Figure 35).

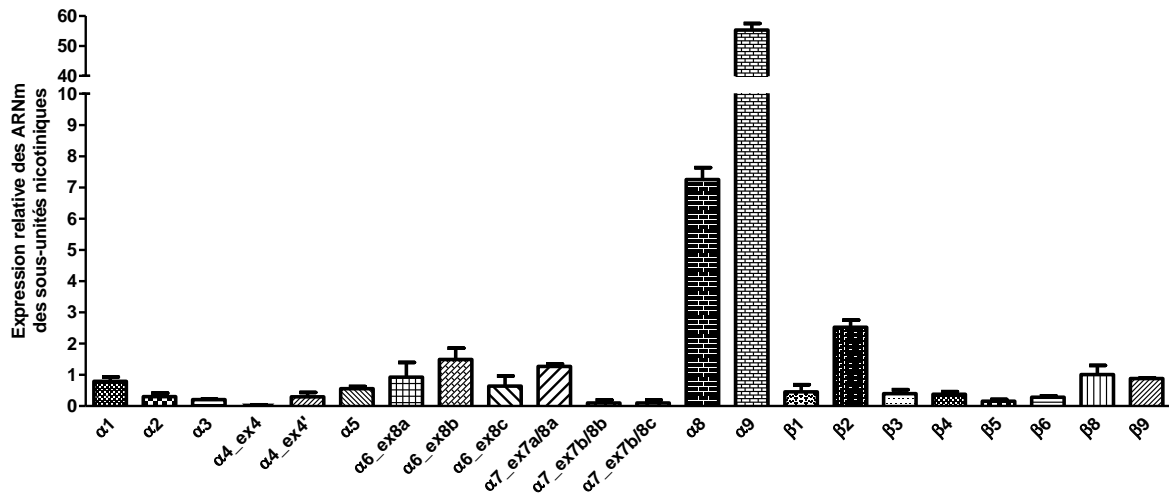


Figure 35. Représentation graphique de la quantification de l'expression relative des ARNm codants pour les sous-unités nicotiniques dans le DGA de la blatte *P. americana*. Les résultats représentent des moyennes \pm S.E.M. ($n = 3$ comprenant au minimum 25 DGA par n).

De plus, l'exposition des blattes pendant 30 jours à la dose sub létale d'Imidaclopride entraînerait une diminution de l'expression des gènes codants pour les sous-unités $\alpha 6$ exon 8a, $\alpha 7$ exon 7a/8c, $\alpha 7$ exon 7b/8c, $\beta 3$ et $\beta 6$ alors que l'expression des gènes codants pour les sous-unités $\alpha 7$ exon 7b/8b et $\alpha 4$ exon 4 augmenterait (Figure 36). Trente jours après l'arrêt de l'exposition à l'Imidaclopride, seules les modifications d'expression pour les sous-unités $\alpha 4$ exon 4 et $\alpha 7$ exon 7b/8c sont maintenues. En revanche, ce temps de repos conduirait à diminuer l'expression des sous-unités $\alpha 1$, $\alpha 4$ exon 4', $\alpha 6$ exon 8c, $\alpha 7$ exons 7a/8a, $\alpha 7$ exons 7b/8b et $\beta 1$ et à augmenter celle des sous-unités $\alpha 4$ exon 4 et $\alpha 6$ exon 8a. Ces profils d'expression ont été représentés sous la forme d'une heatmap permettant de visualiser globalement les variations d'expression de ces gènes d'intérêt (Figure 36).

L'ensemble de ces résultats préliminaires devra être confirmé par analyse en qPCR des différents échantillons.

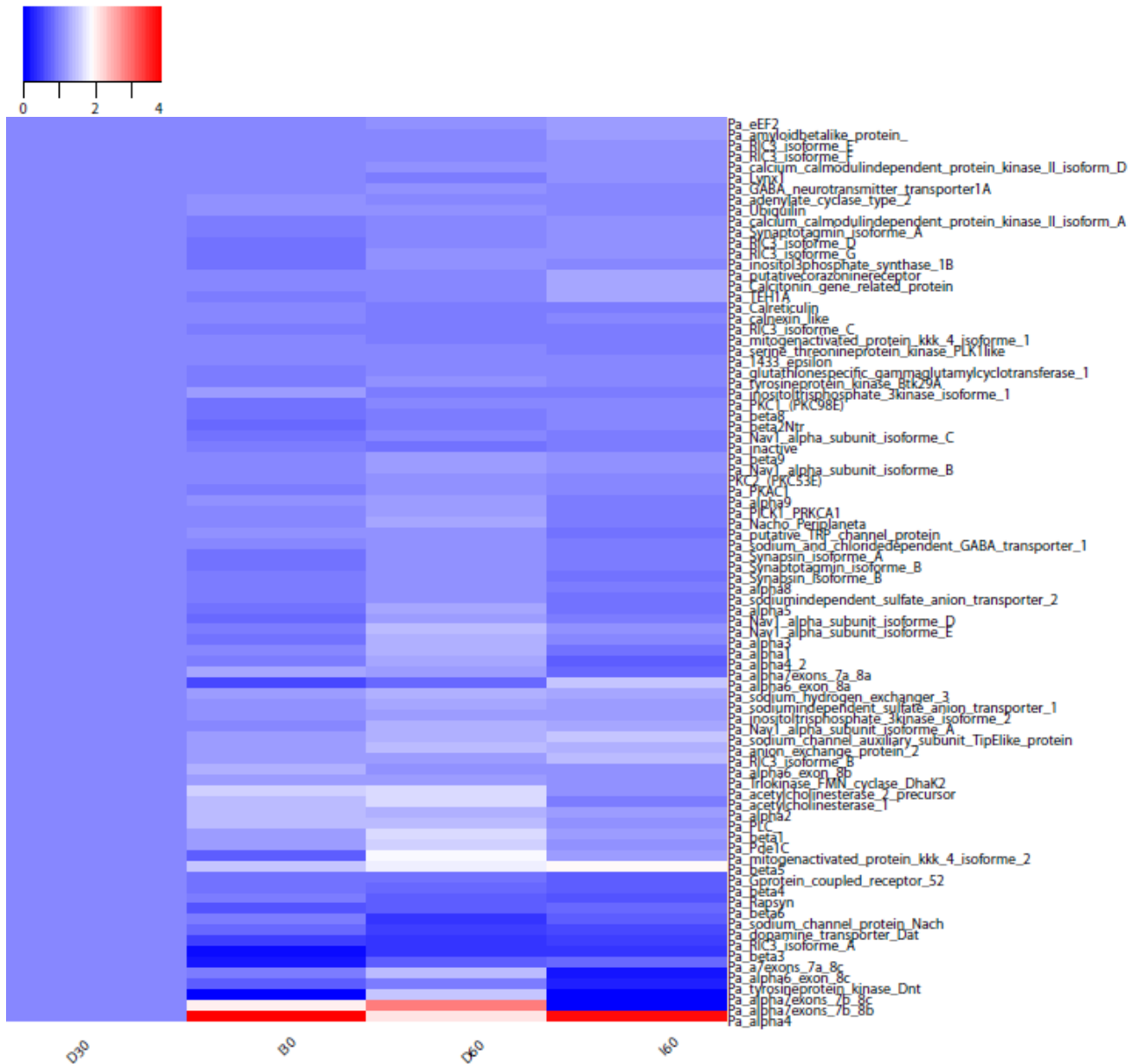


Figure 36. Représentation sous la forme d’une « heatmap » de la quantification de l’expression des gènes d’intérêt en fonction des conditions expérimentales (D30, I30, D60 et I60). Tous les résultats ont été normalisés par rapport à la condition D30.

1.2. Protéines auxiliaires interagissant avec les sous-unités nicotiques

A partir des données de l’analyse RNAseq, l’expression de protéines régulatrices de l’activité des récepteurs nicotiques a été mise en évidence (Figure 37). De plus, différentes isoformes de la protéine RIC-3 ont pu être identifiées. Suite au traitement à l’Imidaclopride, seule l’expression de l’isoforme A de la protéine RIC-3 semble diminuée (Figure 36). Aucune variation d’expression de ces protéines n’est observée 30 jours après l’arrêt du traitement.

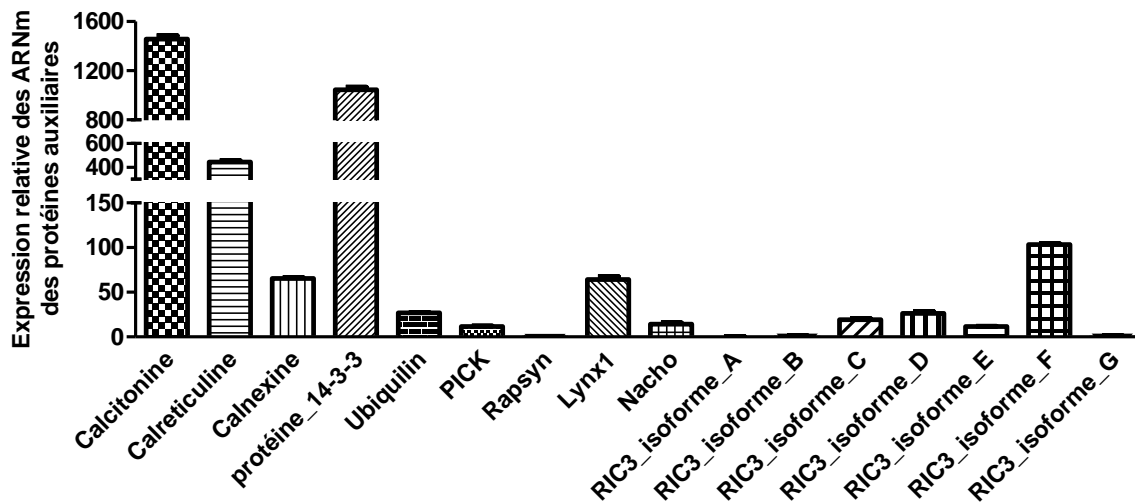


Figure 37. Représentation graphique de la quantification de l’expression relative des ARNm codants pour les protéines auxiliaires dans le DGA de la blatte *P. americana*. Les résultats représentent des moyennes \pm S.E.M. (n = 3 comprenant au minimum 25 DGA par n).

1.3. Protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire

Nous avons identifié dans le transcriptome différentes kinases et phosphatases pouvant modifier l’activité et la sensibilité des nAChRs aux insecticides (Figure 38). L’exposition des blattes à la dose sublétales d’Imidaclopride entraînerait une diminution de l’expression de l’isoforme 2 de la MAPKKK4 et de la protéine kinase Dnt qui est maintenue 30 jours après l’arrêt du traitement à l’Imidaclopride (Figure 36).

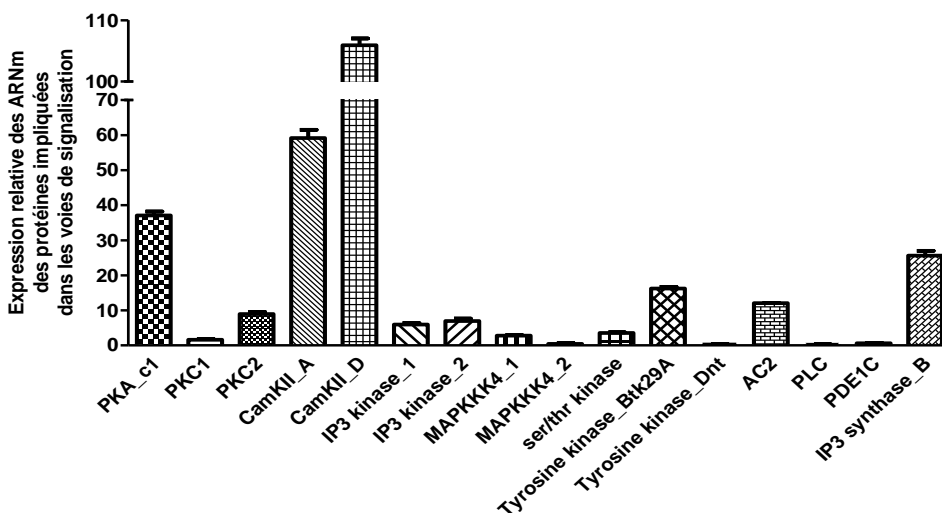


Figure 38. Représentation graphique de la quantification de l’expression relative des ARNm du DGA de la blatte *P. americana* codants pour les protéines impliquées dans les voies de signalisation. Les résultats représentent des moyennes \pm S.E.M. (n = 3 comprenant au minimum 25 DGA par n).

1.4. Protéines impliquées dans le fonctionnement des synapses

Des études précédentes portant sur l'exposition des insectes à une dose sublétalement de néonicotinoïdes a montré que l'expression de diverses protéines synaptiques était modifiée par ce traitement (Christen and Fent, 2017; Shi et al, 2017; Wu et al, 2017; Christen et al, 2018). Parmi ces protéines, 11 ont été identifiées dans le transcriptome issu du DGA de la blatte (Figure 39) et leur expression différentielle a été analysée suite au traitement à l'Imidaclopride (Figure 36). L'expression de l'isoforme D de la sous-unité α des canaux sodiques est diminuée après 30 jours de traitement à une dose sublétalement d'Imidaclopride et cette diminution est maintenue 30 jours après. De plus, quant à l'isoforme E de la sous-unité α des canaux sodiques, son expression est uniquement diminuée après la phase de repos de 30 jours contrairement à celle de Nach qui est augmentée. En revanche, l'expression des acétylcholinestérases 1 et 2 est augmentée 30 jours après le traitement mais est diminuée à 60 jours.

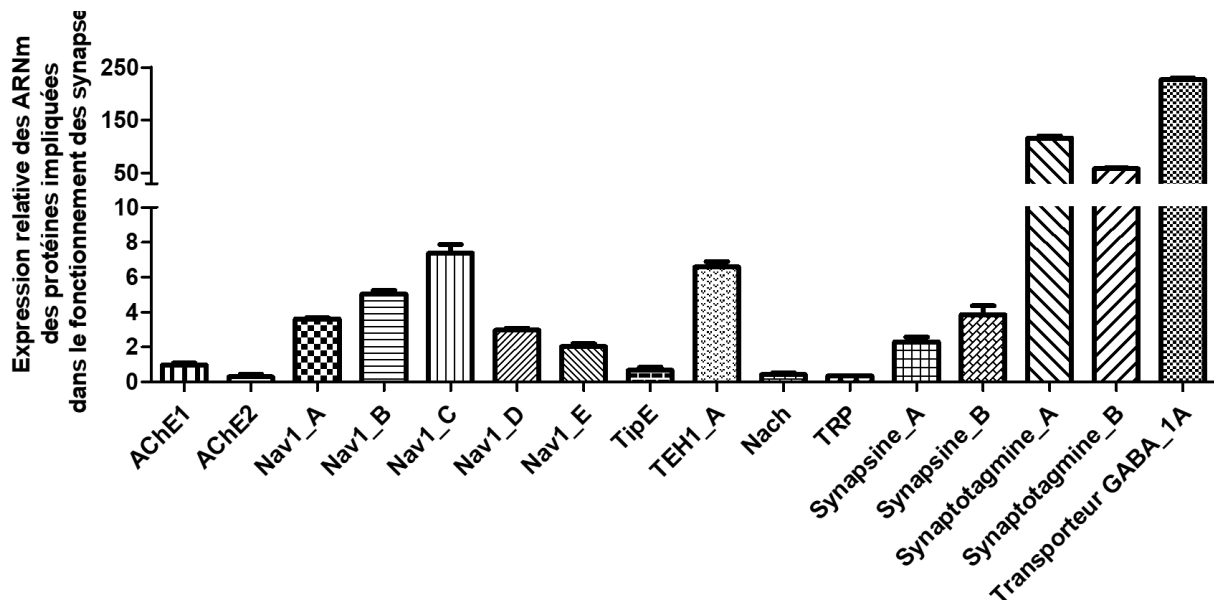


Figure 39. Représentation graphique de la quantification de l'expression relative des ARNm du DGA de la blatte *P. americana* codants pour les protéines impliquées dans les synapses. Les résultats représentent des moyennes \pm S.E.M. (n = 3 comprenant au minimum 25 DGA par n).

Ainsi, grâce à cette expérience, nous avons pu mettre en évidence que certains gènes d'intérêt étaient exprimés dans le DGA de la blatte *P. americana*. Cependant, en utilisant les données de l'analyse RNAseq, aucune différence significative d'expression de ces gènes d'intérêt n'a pu être observée entre les conditions expérimentales. Néanmoins, une quantification par qPCR sera entreprise pour les transcrits présentant une tendance à la modification d'expression dans l'analyse RNAseq.

2. Identification et quantification de l'ensemble des transcrits différentiellement exprimés suite au traitement à l'Imidaclopride des blattes

Afin de déterminer si d'autres transcrits ont une expression qui varie après le traitement à une dose sublétales d'Imidaclopride, nous avons réalisé une analyse globale de l'expression des transcrits en comparant d'une part le transcriptome de blattes témoins et celui de blattes exposées durant 30 jours au traitement (I30) et d'autre part le transcriptome de blattes témoins et celui issu de DGA de blattes prélevés 30 jours après la fin de l'exposition à l'Imidaclopride.

Pour réaliser ces analyses, deux méthodes nommées edgeR et Deseq2 ont été utilisées. La méthode edgeR étant moins restrictive que Deseq2, les transcrits faiblement exprimés ou possédant une forte variabilité d'expression entre les replicats biologiques seront pris en compte dans cette méthode d'analyse (Zhang et al, 2014). C'est pourquoi l'analyse avec edgeR permettra de détecter plus de transcrits différentiellement exprimés. Une fois que les transcrits différentiellement exprimés ont été détectés, un blastn a été réalisé sur les différentes séquences déposées dans la banque de données nr/nt du NCBI pour les identifier. En effet, le génome de la blatte *P. americana* n'étant pas annoté, seule l'homologie de séquence a permis cette identification.

2.1. Identification des gènes différentiellement exprimés après 30 jours de traitement à l'Imidaclopride

Suite à l'exposition des blattes à la dose sublétales d'Imidaclopride pendant 30 jours, la comparaison des niveaux d'expression entre les conditions D30 et I30 a permis d'identifier 68 transcrits différentiellement exprimés avec la méthode Deseq2 et 117 avec la méthode edgeR. 45 transcrits sont communs aux deux analyses (Figure 40).

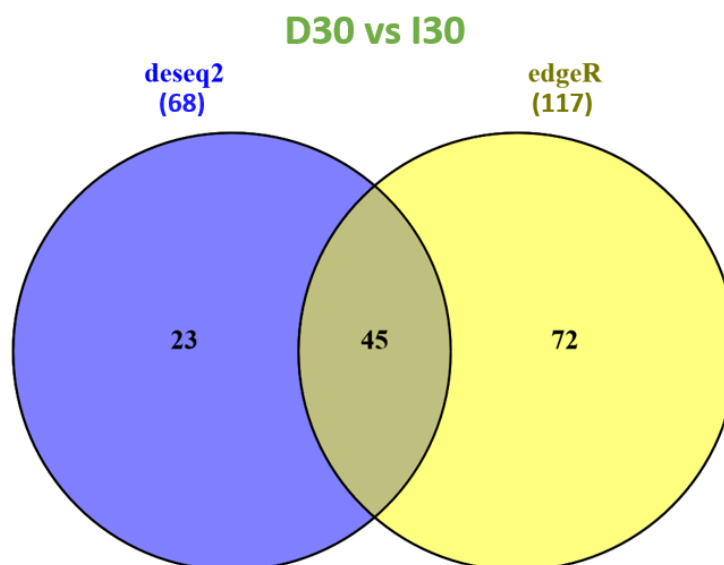


Figure 40. Représentation graphique en diagramme de Venn permettant d'identifier les transcrits différentiellement exprimés entre les conditions D30 et I30 communs aux deux méthodes d'analyse.

Parmi ces 45 gènes différentiellement exprimés communs aux deux méthodes d'analyse, 15 sont surexprimés et 30 sont sous-exprimés. Sur les 15 gènes surexprimés, on retrouve une estérase de la famille des FE4 qui joue un rôle dans la résistance aux insecticides chez le puceron *Myzus persicae* (Field et Devonshire, 1998). Dans les 30 gènes sous-exprimés, on trouve des cytochromes de la famille des CYP6J1. Il a été montré que l'expression de ces cytochromes est augmentée dans une souche de pucerons *Aphis gossypii* résistante au sulfoxaflure (Ma et al, 2019).

Les autres transcrits différentiellement exprimés qui ont été mis en évidence dans chacune des deux méthodes d'analyse (23 et 72 par *deseq2* et *edgeR* respectivement) seront ensuite identifiés.

2.2. Identification des gènes différentiellement exprimés 30 jours après l'arrêt du traitement à l'Imidaclopride

La comparaison du niveau d'expression des gènes chez des blattes témoins (D60) et des blattes prélevées 30 jours après l'exposition à l'Imidaclopride permet de déterminer avec la méthode *deseq2* que 168 gènes sont différentiellement exprimés et 234 avec la méthode *edgeR*, 76 transcrits sont communs aux deux méthodes (Figure 41). Parmi ces 76 transcrits, 17 sont surexprimés et 59 sont sous-exprimés. Leur identification a été réalisée par homologie de séquence. Ainsi, parmi les gènes surexprimés, on peut noter la présence d'un échangeur Na^+/H^+ (SLC9B2) et de la protéine SETMAR qui est impliquée dans la régulation d'expression de gènes et dans la méthylation de l'histone H3 (Lee et al, 2005; Fnu et al, 2011).

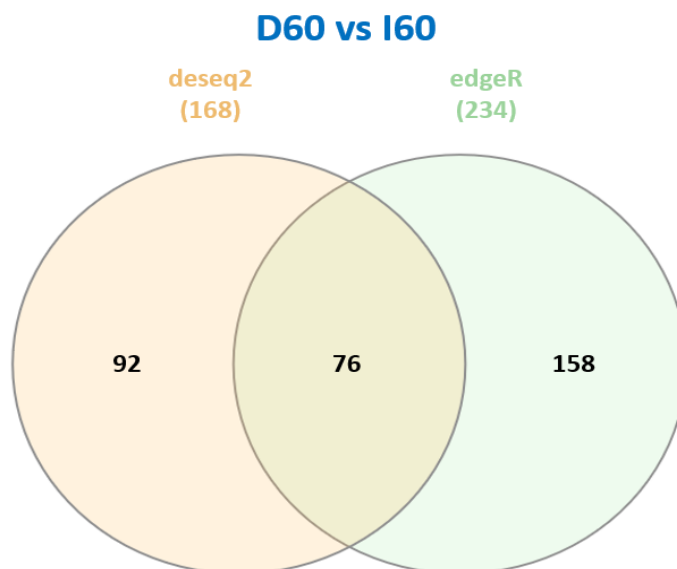


Figure 41. Représentation graphique en diagramme de Venn permettant d'identifier les transcrits différentiellement exprimés entre les conditions D60 et I60 communs aux deux méthodes d'analyse

Parmi les gènes sous-exprimés, on peut remarquer une diminution d'expression d'une kinase, l'UMP-CMP kinase, impliquée dans l'homéostasie de l'ATP (Amiri et al, 2013) ou la diminution d'expression d'une transposase, Mariner Mos1, impliquée dans les mécanismes de transposition d'ADN.

L'identification des autres transcrits dont l'expression varie uniquement dans chacune des deux méthodes d'analyse (92 et 158 par deseq2 et edgeR respectivement) sera ensuite entreprise.

2.3. Identification des gènes pour lesquels la différence d'expression est maintenue 30 jours après l'arrêt du traitement à l'Imidaclopride

Les études toxicologiques ont montré que la perte de sensibilité des blattes à l'Imidaclopride induite par leur exposition à une dose sub létale d'Imidaclopride est maintenue 30 jours après l'arrêt de l'exposition. Afin de déterminer si ce maintien est lié à la persistance des modifications d'expression de gènes, les gènes différentiellement exprimés à 30 jours sont comparés à ceux identifiés à 60 jours avec la méthode deseq2. La figure 42 montre que seuls deux gènes dont l'expression varie sont communs aux deux conditions. Sur ces 2 gènes différentiellement exprimés, seule une endochitinase de type A1 a pu être identifiée comme étant surexprimée en condition I30 et I60.

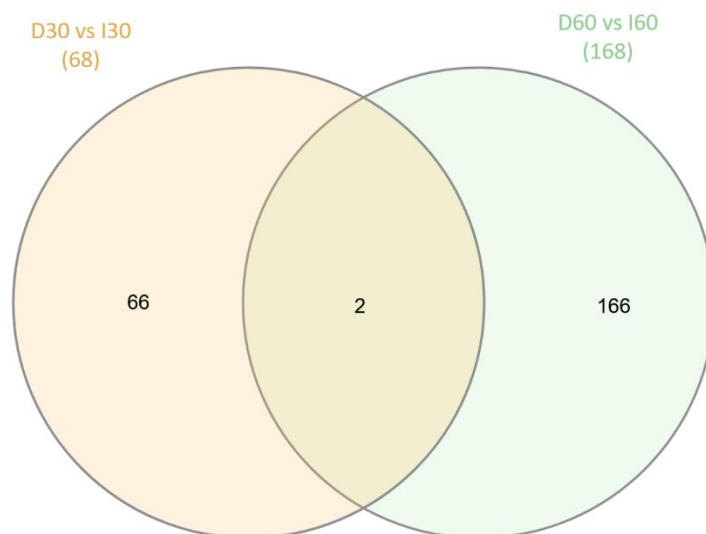


Figure 42. Représentation graphique en diagramme de Venn permettant d'identifier les transcrits différentiellement exprimés communs à 30 jours (I30) et à 60 jours (I60).

3. Conclusion

Grâce à cette étude, nous avons pu obtenir un transcriptome du DGA de la blatte *P. americana*. A partir de ce transcriptome, nous avons pu identifier les principaux acteurs pouvant être impliqués dans le fonctionnement des récepteurs nicotiniques. Des études complémentaires sont nécessaires pour caractériser les gènes différentiellement exprimés et pour déterminer leur

implication dans les phénomènes d'accommodation mis en place suite à l'exposition des blattes à une dose sub létale d'Imidaclopride.

Partie 4 : Discussion

Le but de ces travaux était de déterminer si une exposition des blattes *P. americana* à une dose sublétales d'Imidaclopride entraînait des modifications cellulaires capables de rendre les blattes moins sensibles à l'Imidaclopride et si ces modifications responsables de l'accommodation des blattes à l'Imidaclopride persistaient. Grâce à des tests toxicologiques, nous avons comparé la mortalité induite par une intoxication aiguë d'Imidaclopride chez des blattes témoins et chez des blattes exposées. Les blattes exposées présentant un taux de mortalité plus faible que les blattes témoins, nous avons conclu que ces blattes avaient développé des mécanismes leur permettant de s'accommoder à leur environnement. Les mêmes tests ont été réalisés 30 jours après l'arrêt de l'exposition subchronique à l'Imidaclopride et nous avons ainsi démontré que la perte de sensibilité à l'Imidaclopride des blattes exposées était maintenue au bout de 30 jours. Des études précédentes portant sur l'effet d'une exposition à des doses sublétales d'insecticides sur les insectes ont montré que cette exposition pouvait parfois être bénéfique aux insectes en leur permettant d'améliorer leur fonction reproductrice, leur fertilité ou bien encore en favorisant leur développement (Lalouette et al, 2016; Rix et al, 2016; Guedes et al, 2017; Bantz et al, 2018). Pour la première fois, nous avons donc démontré qu'une exposition des insectes à une dose sublétales d'insecticide pouvait leur permettre d'anticiper un potentiel contact avec cet insecticide en diminuant leur sensibilité à ce même insecticide. Guedes et ses collaborateurs (2017) ont suggéré qu'en favorisant la survie et la reproduction de certains insectes, une exposition à une dose sublétales contribuait au développement d'insectes résistants aux insecticides. Grâce à notre étude, nous pouvons ajouter que le développement d'insectes résistants peut être favorisé par la modification de la sensibilité aux insecticides après une exposition des insectes à une dose sublétales d'insecticide.

La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents est donc indispensable afin de développer des stratégies de lutte contre les insectes nuisibles tout en empêchant l'émergence d'insectes résistants. Une des barrières de défense des insectes face aux xénobiotiques, généralement impliquées dans la résistance aux insecticides, est l'augmentation de l'activité des enzymes de détoxification. Parmi ces enzymes, les carboxylestérases (CE), la glutathion S-transferase (GST) et les oxydases à fonctions multiples (MFO) sont les plus étudiées (Daborn et al, 2012; Romero et Anderson, 2016; Bass et Jones, 2018; Pavlidi et al, 2018). Cependant, la blatte présentant une autofluorescence très importante, nous n'avons pas pu mesurer par les techniques classiquement utilisées les modifications de l'activité des MFO en fonction des conditions expérimentales dans notre étude. Nos différents échantillons présentaient une fluorescence totale incluant l'autofluorescence et la fluorescence du produit de réaction enzymatique des MFO proche de l'autofluorescence, ceci pourrait alors suggérer que les variations d'activité des MFO soient faibles dans nos différentes conditions. La comparaison de l'activité des CE et celle de la GST entre des blattes témoins et des blattes

exposées pendant 30 jours à la dose sublétales d'Imidaclopride montre que seule l'activité de la GST est légèrement augmentée chez les blattes exposées. En revanche, après 30 jours de repos, l'activité des deux types d'enzyme augmente légèrement. En comparant cette légère augmentation avec l'augmentation de l'activité des enzymes de détoxification observée chez les insectes résistants (Wang et al, 2002; Feng et al, 2010; Yang et al, 2016; Ma et al, 2017), nous avons émis l'hypothèse que cette augmentation pouvait participer à l'accommodation des blattes à l'Imidaclopride, mais qu'elle ne correspondait pas au phénomène majeur induisant cette accommodation. De plus, ces résultats pourraient suggérer que l'activité de certaines enzymes de détoxification pourrait être modifiée en réponse à un stress oxydatif général.

Étant donné que l'Imidaclopride est un insecticide neurotoxique dont les principales cibles moléculaires sont les récepteurs nicotiques, nous avons voulu déterminer si l'exposition des blattes à une dose sublétales d'Imidaclopride pouvait modifier ces récepteurs de manière à rendre les blattes moins sensibles à l'Imidaclopride. Une précédente étude réalisée au laboratoire a montré une modification de l'expression de certaines sous-unités nicotiques dans le DGA de blattes exposées à cette même dose d'Imidaclopride et une diminution de sensibilité à l'Imidaclopride des neurones DUM présents dans le DGA (Benzidane et al, 2017). Dans nos travaux, nous avons démontré qu'après 30 jours d'exposition à l'Imidaclopride, la perte de sensibilité des blattes vis-à-vis de cet insecticide est corrélée avec une diminution de l'expression de la sous-unité nicotique $\alpha 2$ et une augmentation de l'expression de la sous-unité nicotique $\alpha 1$. Une augmentation similaire de la sous-unité $\alpha 1$ a été observée chez les pucerons *Acyrtosiphon pisum* exposés à l'Imidaclopride (Taillebois et al, 2014). Ces modifications d'expression sont également retrouvées 30 jours après l'arrêt du traitement à l'Imidaclopride. L'importance de la sous-unité $\alpha 2$ dans ce phénomène d'accommodation a été confirmée par l'utilisation d'ARN interférent ciblant cette sous-unité nicotique. Ainsi, la diminution de l'expression de la sous-unité nicotique $\alpha 2$ observée chez les blattes exposées est un facteur clé dans la perte de sensibilité de ces blattes pour l'Imidaclopride. Dans la littérature, il a été montré qu'une perte de sensibilité des insectes pour l'Imidaclopride liée à la cible moléculaire était souvent associée à des mutations ponctuelles sur les sous-unités $\beta 1$, $\alpha 1$ et $\alpha 3$ (Liu et al, 2005, 2006; Bass et al, 2011, 2015; Matsuda et al, 2020). Cependant, il a également été reporté dans la littérature qu'une diminution de l'expression de certaines sous-unités nicotiques telles que $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 8$ et $\beta 1$ contribuait à diminuer la sensibilité des insectes à l'Imidaclopride voire à les rendre résistants (Markussen et Kristensen, 2010; Zhang et al, 2015; Shan et al, 2020). L'impact de la diminution de la sous-unité $\alpha 2$ sur la sensibilité à l'Imidaclopride a été étudié chez la mouche domestique *Musca domestica* (Markussen et Kristensen, 2010). Les mouches résistantes à l'Imidaclopride présentaient, en plus de cette diminution de l'expression de la sous-unité $\alpha 2$, une modification de l'activité des enzymes de détoxification (Markussen et Kristensen, 2010). Cette sous-unité nommée Md $\alpha 2$ est identique à plus de 88% à la sous-unité $\alpha 2$ de la drosophile *Drosophila melanogaster* (Gao et al, 2007). La co-expression dans un système hétérologue de la sous-unité $\alpha 2$ de drosophile et de la sous-unité $\beta 2$ de poulet a montré que ce

récepteur chimérique était sensible à l'Imidaclopride (Shimomura et al, 2004, 2005, 2006). De plus, il a été montré que l'intervalle entre les boucles B et C serait impliqué dans la sensibilité à l'Imidaclopride (Shimomura et al, 2004). Par contre, en ce qui concerne la sous-unité nicotinique $\alpha 2$ de la blatte *P. americana*, il a été montré que cette sous-unité participait avec les sous-unités nicotiniques $\alpha 1$ et $\beta 1$ à la formation d'un sous-type de récepteurs nicotiniques appelés nAChR2 qui est insensible à l'Imidaclopride (Sun et al, 2017). Cette différence de sensibilité entre les nAChRs contenant la sous-unité $\alpha 2$ pourrait être due à un assemblage différent de sous-unités formant les nAChRs ou aux 2 différences observées entre les boucles B et C dans la séquence de la sous-unité $\alpha 2$ de blatte par rapport à celles de la mouche *M. domestica* et de la drosophile *D. melanogaster*. Chez la blatte, la conformation du sous-type nAChR2 n'est pas clairement établie. Ainsi, différentes combinaisons de sous-unités nicotiniques telles que $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 1\alpha 2$ et $\alpha 1\alpha 2\beta 1$ peuvent être envisagées pour le sous-type nAChR2. En diminuant l'expression de la sous-unité $\alpha 2$, la blatte exposée favoriserait la conformation $\alpha 1\beta 1$. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que la blatte exposée augmente l'expression de la sous-unité nicotinique $\alpha 1$. Nous avons essayé de diminuer l'expression de cette sous-unité par la technologie d'ARN interférence afin de confirmer cette hypothèse, mais à ce jour, nous n'avons pas obtenu d'ARN interférents ciblant spécifiquement cette sous-unité.

Étant donné que la sous-unité $\beta 1$ est impliquée dans la formation de certains nAChRs insensibles à l'Imidaclopride chez la blatte et que différentes études ont montré qu'une mutation dans cette sous-unité entraînait une résistance à l'Imidaclopride (Bass et al, 2011; Chen et al, 2017; Hirata et al, 2017; Wang et al, 2018; Shan et al, 2020), nous avons émis l'hypothèse que la diminution de l'expression de cette sous-unité pourrait permettre de restaurer la sensibilité des blattes exposées à l'Imidaclopride. En effet, lorsque les blattes accommodées ingèrent des siRNA dirigés contre la sous-unité $\beta 1$, ces blattes retrouvent la même sensibilité que les blattes témoins. De plus, les blattes témoins qui ont ingéré ces mêmes siRNA ne présentent pas de modification de sensibilité à une intoxication aiguë d'Imidaclopride. Ainsi, ces expériences suggèrent soit que la sous-unité nicotinique $\beta 1$ ne jouerait pas un rôle majeur dans la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride lorsque ces dernières n'ont pas été exposées à l'insecticide ou soit que la diminution de cette sous-unité serait compensée chez ces blattes. En revanche, une fois les blattes exposées à une dose sublétales d'Imidaclopride, le maintien de l'expression de la sous-unité $\beta 1$ est primordiale pour résister à une nouvelle exposition à cet insecticide. Ainsi, ces expériences nous montrent que l'utilisation de la technologie d'ARN interférence ciblant un acteur clé du système cholinergique tel que la sous-unité nicotinique $\beta 1$ permettant de contourner les résistances aux insecticides pourrait être envisagée dans de nouvelles stratégies de lutte contre les ravageurs de cultures.

L'étude précédente réalisée chez la blatte a également montré que les neurones DUM de blattes exposées à une dose sublétales d'Imidaclopride sont moins sensibles à l'Imidaclopride (Benzidane et al, 2017). Parmi les sous-types de nAChRs sensibles à l'Imidaclopride, on trouve le sous-type

nAChR1 (Courjaret et Lapied, 2001; Sun et al, 2017) . Le sous-type nAChR1 est insensible à l' α -bungarotoxine et les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 8$ et $\beta 1$ participeraient à sa formation (Sun et al, 2017) . Cependant, Benzidane et ses collaborateurs ont montré que la perte de sensibilité des neurones DUM à l'Imidaclopride n'était pas liée à une variation d'expression des sous-unités nicotiniques qui entrent dans la composition de nAChR1. On peut alors émettre 2 hypothèses : 1) il existe d'autres nAChRs sensibles à l'Imidaclopride qui seraient sensibles à l' α -bungarotoxine et 2) l'activation de voies de signalisation intracellulaire modifierait la sensibilité de nAChR1 à l'Imidaclopride.

Grâce à l'analyse du génome de la blatte *P. americana*, 19 gènes codants pour des sous-unités nicotiniques ont été identifiés (Jones et al, en révision). Ainsi, le génome de la blatte possède 9 sous-unités α ($\alpha 1$ - $\alpha 9$) et 10 sous-unités β ($\beta 1$ - $\beta 10$) et présente la particularité d'avoir un nombre important de sous-unités nicotiniques divergentes. Notre analyse du transcriptome issu de DGA de blattes a permis de montrer que parmi ces 19 sous-unités, seules les sous-unités $\beta 7$ et $\beta 10$ ne sont pas exprimées et que la sous-unité divergente $\alpha 9$ est une des sous-unités les plus exprimées suggérant un rôle essentiel de ces protéines divergentes dans le SNC des insectes. De plus, les variants des sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 6$ et $\alpha 7$ liés à l'épissage alternatif ainsi que les variants de la sous-unité $\alpha 6$ liés à l'édition d'ARN augmentent la diversité des nAChRs retrouvés au sein du DGA. Nos résultats préliminaires obtenus à partir de l'analyse des données RNAseq suggèrent que l'expression des gènes codants pour les sous-unités $\alpha 6$ exon 8a, $\alpha 7$ exon 7a/8c, $\alpha 7$ exon 7b/8c, ainsi que pour les sous-unités divergentes $\beta 3$ et $\beta 6$ diminuerait alors que celle des gènes codants pour les sous-unités $\alpha 7$ exon 7b/8b et $\alpha 4$ exon4 augmenterait lorsque les blattes sont exposées 30 jours à une dose sub létale d'Imidaclopride. Ainsi, d'autres sous-unités nicotiniques pourraient jouer un rôle dans l'accommodation des blattes. Une étude préliminaire réalisée au laboratoire SiFCIR suggère que la diminution de l'expression de la sous-unité $\alpha 7$ chez la blatte par l'interférence ARN entraînerait une diminution de la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride (Ligonnière, 2020). Bien qu'une modélisation de l'interaction entre la sous-unité $\alpha 6$ de blatte et l'Imidaclopride a permis de montrer que cette sous-unité pouvait lier l'Imidaclopride (Selvam et al, 2015), il serait intéressant de déterminer si ces sous-unités différemment exprimées sont impliquées dans la formation de nAChRs sensibles à l'Imidaclopride. Nos résultats de l'étude des gènes différemment exprimés suggèrent également que la modification de l'expression d'autres sous-unités nicotiniques viendrait s'ajouter à l'augmentation de l'expression d' $\alpha 4$ exon4 et à la diminution de celle d' $\alpha 7$ exon 7b/8c pour permettre le maintien du phénomène d'accommodation des blattes à l'Imidaclopride.

De nombreuses études montrent que l'expression et l'activité des nAChRs sont modulées par leurs protéines auxiliaires comme par exemple NACHO (novel nAChR regulator) ou RIC-3 (resistance to inhibitor of cholinesterase 3) (Millar, 2008; Jones et al, 2010; Matta et al, 2017). Grâce à l'analyse du transcriptome, nous avons déterminé l'expression de certaines de ces protéines dans le DGA de la blatte et différentes isoformes de RIC-3 ont été mises en évidence.

Suite à l'exposition à l'Imidaclopride pendant 30 jours, seule l'expression de l'isoforme A de la protéine RIC-3 semble diminuée et aucune variation de ces protéines n'est observée 30 jours après l'arrêt du traitement. Les protéines RIC-3 sont des protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique qui jouent un rôle dans l'assemblage et l'adressage des nAChRs à la membrane plasmique. La structure et le rôle des isoformes RIC-3 ont été étudiés chez la drosophile *D. melanogaster* (Millar, 2008; Lansdell et al, 2008) et chez le criquet migrateur *Locusta migratoria* (Bao et al, 2018). L'effet de RIC-3 sur l'expression des nAChRs varie en fonction de l'isoforme impliquée. Il serait alors important de caractériser l'isoforme A de RIC-3 chez la blatte *P. americana* afin de déterminer son rôle dans l'accommodation de l'insecte à l'Imidaclopride.

La sensibilité des nAChRs aux insecticides varie en fonction de leur état de phosphorylation/déphosphorylation lié respectivement à l'activité de kinases et de phosphatases (Thany et al, 2007; Raymond et al, 2017). D'après notre étude du transcriptome issu de DGA de blatte, une diminution de l'expression de l'isoforme 2 de la MAPKKK4 et de la kinase Dnt est induite par l'exposition à une dose sublétales d'Imidaclopride des blattes et ces modifications sont maintenues 30 jours après l'arrêt du traitement. Ainsi, la diminution de la sensibilité des blattes à l'Imidaclopride pourrait être associée à un manque de phosphorylation des nAChRs et plus précisément du sous-type nAChR1 puisqu'il a été montré que la réponse à l'Imidaclopride des nAChR1 présents sur les neurones DUM de blattes était augmentée en présence d'acide okadaïque qui est un inhibiteur de phosphatases (Courjaret et Lapied, 2001). De plus, il est important de prendre en considération que la MAPKKK4 est impliquée dans la mort cellulaire associée à une accumulation d'oxydants (Li et al, 2015). La diminution de cette protéine pourrait alors jouer un rôle dans la neuroprotection.

Enfin, notre analyse du transcriptome suggère également que l'expression des acétylcholinestérases 1 et 2 serait augmentée dans le DGA des blattes exposées et que 30 jours après le traitement, leur expression serait diminuée. Il serait alors intéressant de relier la modification des nAChRs à ces variations d'expression des acétylcholinestérases pour déterminer s'il existe un lien de cause à effet.

Conclusions et perspectives

L'ensemble de ces travaux de thèse nous a permis :

- de déterminer qu'une exposition des blattes *P. americana* à une dose sub létale d'Imidaclopride pendant 30 jours entraîne des modifications cellulaires et moléculaires conduisant à une diminution de la sensibilité des blattes à cet insecticide
- de montrer que les blattes sont capables de s'acclimater à leur environnement et que cette acclimatation persiste 30 jours après l'arrêt de l'intoxication
- de mettre en évidence que les sous-unités nicotiques $\alpha 2$ et $\beta 1$ jouent un rôle primordial dans cette acclimatation
- d'identifier toutes les sous-unités nicotiques présentes dans le génome et celles exprimées dans le DGA de la blatte
- d'envisager l'implication des voies de régulation des récepteurs nicotiques dans l'acclimatation grâce à l'analyse des transcrits différemment exprimés chez des blattes exposées

Ces travaux et les connaissances sur les nAChRs d'insectes pourraient contribuer au développement de stratégies agro-écologiques, alternatives aux produits phytosanitaires, qui seront plus spécifiques que les molécules actuelles et qui seront également applicables sur des insectes résistants tout en épargnant les insectes bénéfiques.

Des études complémentaires devront être entreprises pour atteindre cet objectif. Dans un 1^{er} temps, les variations d'expression des gènes d'intérêt identifiés dans l'étude basée sur l'analyse RNaseq devront être confirmées par PCR quantitative. Une attention particulière pourra être portée sur les sous-unités nicotiques divergentes qui par définition présentent un grand intérêt pour le développement de nouvelles stratégies plus respectueuses de l'environnement. Dans un 2^{ème} temps, il pourrait être intéressant d'étudier la pharmacologie des récepteurs nicotiques dans un système hétérologue afin de déterminer parmi les différentes sous-unités nicotiques, celles qui sont capables de former des récepteurs sensibles à l'Imidaclopride. Sachant que les sous-unités nicotiques ont une expression spatio-temporelle, le choix des différentes combinaisons de sous-unités pourra être déterminé par RT-PCR sur cellule unique. De plus, nous pourrions analyser l'effet d'une exposition chronique à une dose sub létale d'Imidaclopride afin de démontrer si les modifications cellulaires et moléculaires décrites dans ces travaux de thèse sont transmises aux générations suivantes. Enfin, l'étude des marqueurs épigénétiques permettrait de vérifier si cette exposition à une dose sub létale d'insecticide pourrait contribuer à la mise en place de phénomènes de résistance.

Bibliographie

- Ahn J.H et al. 2007. "Protein Kinase A Activates Protein Phosphatase 2A by Phosphorylation of the B56 Subunit." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(8): 2979–84. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0611532104>.
- Albuquerque Edson X, Pereira Edna F.R, Alkondon Manickavasagam and Rogers Scott W. 2009. "Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function." *Physiological Reviews* 89(1): 73–120. <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00015.2008>.
- Aleman-Meza Boanerges et al. 2017. "High-Content Behavioral Profiling Reveals Neuronal Genetic Network Modulating Drosophila Larval Locomotor Program." *BMC Genetics* 18(1): 40. <https://bmcbgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12863-017-0513-7>.
- Allis C David and Jenuwein Thomas. 2016. "The Molecular Hallmarks of Epigenetic Control." *Nature Reviews Genetics* 17(8): p487–500. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.59>.
- Altschul Stephen F et al. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215(3): p403–10. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283605803602> (May 5, 2020).
- Alyokhin Andrei and Chen Yolanda H. 2017. "Adaptation to Toxic Hosts as a Factor in the Evolution of Insecticide Resistance." *Current Opinion in Insect Science* 21: 33–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.006>.
- Amiri Marjan et al. 2013. "The Human Adenylate Kinase 9 Is a Nucleoside Mono- and Diphosphate Kinase." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 45(5): p925–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.004>.
- Anand R et al. 1991. "Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in Xenopus Oocytes Have a Pentameric Quaternary Structure." *Journal of Biological Chemistry* 266(17): p11192–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2040627> (May 5, 2020).
- Balabanidou Vasileia, Grigoraki Linda and Vontas John. 2018. "Insect Cuticle: A Critical Determinant of Insecticide Resistance." *Current Opinion in Insect Science* 27: p68–74. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.03.001>.
- Ballivet M, Patrick J, Lee J and Heinemann S, 1982. "Molecular Cloning of cDNA Coding for the Gamma Subunit of Torpedo Acetylcholine Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79(14): p4466–70. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.79.14.4466>.
- Bantz Alexandre et al. 2018. "Exposure to Sublethal Doses of Insecticide and Their Effects on Insects at Cellular and Physiological Levels." *Current Opinion in Insect Science* 30: p73–78.
- Bao Haibo et al. 2018. "Dual Effects of Insect NACHR Chaperone RIC-3 on Hybrid Receptor: Promoting Assembly on Endoplasmic Reticulum but Suppressing Transport to Plasma Membrane on Xenopus Oocytes." *Neurochemistry International* 115: p24–30.
- Barbara Guillaume Stéphane et al. 2008. "Study of Nicotinic Acetylcholine Receptors on Cultured Antennal Lobe Neurons from Adult Honeybee Brains." *Invertebrate Neuroscience* 8(1): p19–29. <http://link.springer.com/10.1007/s10158-007-0062-2>.
- Barbara Kathryn A. 2014. "American Cockroach - *Periplaneta Americana* (Linnaeus)." University of Florida: p1–5. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/roaches/american_cockroach.htm.
- Bass Brenda L. 2002. "RNA Editing by Adenosine Deaminases That Act on RNA." *Annual Review of Biochemistry* 71(1): p817–46.
- Bass Chris et al. 2011. "Mutation of a Nicotinic Acetylcholine Receptor β Subunit Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus persicae*." *BMC Neuroscience* 12(1): 51. <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/12/51>.
- Bass Chris, Denholm Ian, Williamson Martin S and Nauen Ralf. 2015. "The Global Status of Insect Resistance to Neonicotinoid Insecticides." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121: p78–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004>.
- Bass Chris and Field Linda M. 2011. "Gene Amplification and Insecticide Resistance." *Pest Management Science* 67(8): p886–90. <http://doi.wiley.com/10.1002/ps.2189>.
- Bass Chris and Christopher M. Jones. 2018. "Editorial Overview: Pests and Resistance: Resistance to Pesticides in Arthropod Crop Pests and Disease Vectors: Mechanisms, Models and Tools." *Current Opinion in Insect Science* 27: iv–vii.
- Baum James A and Roberts James K. 2014. *47 Advances in Insect Physiology Progress Towards RNAi-Mediated Insect Pest Management*. 1st ed. Elsevier Ltd. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800197-4.00005-1>.
- Bell William J. and Adiyodi K. G. 1982. *The American Cockroach*. eds. William J. Bell and K. G. Adiyodi. Dordrecht: Springer Netherlands. <http://link.springer.com/10.1007/978-94-009-5827-2> (June 5, 2020).
- Bentley Geoffrey N, Jones Andrew K, Oliveros Parra William G and Agnew Alison. 2004. "ShAR1 α and ShAR1 β : Novel Putative Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits from the Platyhelminth Blood Fluke *Schistosoma*." *Gene* 329(1–2): p27–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15033526> (May 6, 2020).
- Benzidane Yassine et al. 2017. "Subchronic Exposure to Sublethal Dose of Imidacloprid Changes Electrophysiological Properties and Expression Pattern of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in Insect Neurosecretory Cells." *NeuroToxicology* 62: p239–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.08.001>.
- Bertrand Daniel and Gopalakrishnan Murali. 2007. "Allosteric Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Biochemical Pharmacology* 74(8): p1155–63. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295207004637>.
- Bhardwaj Laxmikant, Sharma Sandeep, Ranjan Anuj and Jindal Tanu. 2019. "Persistent Organic Pollutants in Lakes of Broknes Peninsula at Larsemann

Bibliographie

- Hills Area, East Antarctica." *Ecotoxicology* 28(5): p589–96. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-019-02045-x> (June 4, 2020).
- Birdsall N.J.M, and Hulme E.C. 1976. "Biochemical Studies on Muscarinic Acetylcholine Receptors." *Journal of Neurochemistry* 27(1): p7–16. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.1976.tb01536.x> (May 5, 2020).
- Blagburn Jonathan M and Sattelle D.B. 1987. "Nicotinic Acetylcholine Receptors on a Cholinergic Nerve Terminal in the Cockroach, *Periplaneta Americana*." *Journal of Comparative Physiology A* 161(2): p215–25.
- Bodereau-Dubois B. 2011. "Récepteurs Nicotiniqes Neuronaux d'insectes et Insecticides : Caractérisation de Facteurs Cellulaires Impliqués Dans La Modulation de l'efficacité Des Néonicotinoïdes." Université d'Angers.
- Bodereau-Dubois B, List O, Calas-List D, Marques O, Communal P-Y, Thany S.H, Lapied B. 2012. "Transmembrane Potential Polarization, Calcium Influx, and Receptor Conformational State Modulate the Sensitivity of the Imidacloprid-Insensitive Neuronal Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor to Neonicotinoid Insecticides." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 341(2): p326–39. <http://jpet.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/jpet.111.188060>.
- Bonmatin J-M. et al. 2015. "Environmental Fate and Exposure; Neonicotinoids and Fipronil." *Environmental Science and Pollution Research* 22(1): p35–67. <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-3332-7>.
- Borel Brooke. 2017. "When the Pesticides Run Out." *Nature* 543(7645): 302–4.
- Bossy Blaise, Ballivet Marc, and Spierer Pierre. 1988. "Conservation of Neural Nicotinic Acetylcholine Receptors from *Drosophila* to Vertebrate Central Nervous Systems." 7(3): p611–18.
- Braunig Peter and Pflüger Hans Joachim. 2001. 28 *Advances in Insect Physiology The Unpaired Median Neurons of Insects*.
- Breer H, Kleene R and Hinz G. 1985. "Molecular Forms and Subunit Structure of the Acetylcholine Receptor in the Central Nervous System of Insects." *Journal of Neuroscience* 5(12): p3386–92.
- Breer H, and Sattelle D.B. 1987. "Molecular Properties and Functions of Insect Acetylcholine Receptors." *Journal of Insect Physiology* 33(11): p771–90.
- Brejč Katjuša et al. 2001. "Crystal Structure of an ACh-Binding Protein Reveals the Ligand-Binding Domain of Nicotinic Receptors." *Nature* 411(6835): p269–76.
- Brevik Kristian, Lindström Leena, McKay Stephanie D and Chen Yolanda H. 2018. "Transgenerational Effects of Insecticides — Implications for Rapid Pest Evolution in Agroecosystems." *Current Opinion in Insect Science* 26(January): p34–40.
- Buckingham S. D. et al. 1997. "Imidacloprid Actions on Insect Neuronal Acetylcholine Receptors." *Journal of Experimental Biology* 200(21): 2685–92.
- Burnett G.F and O'Brien R.D. 1968. "Insecticides, Action and Metabolism." *The Journal of Applied Ecology* 5(3): 746. <https://www.jstor.org/stable/2401651?origin=crossref>.
- Busvine J.R. 1951. "Mechanism of Resistance to Insecticide in Houseflies." *Nature* 168(4266): p193–95.
- Butt Simon J.B and Pitman R.M. 2005. "Indirect Phosphorylation-Dependent Modulation of Postsynaptic Nicotinic Acetylcholine Responses by 5-Hydroxytryptamine." *European Journal of Neuroscience* 21(5): p1181–88.
- Butt Simon J.B and Pitman R.M. 2002. "Modulation by 5-Hydroxytryptamine of Nicotinic Acetylcholine Responses Recorded from an Identified Cockroach (*Periplaneta Americana*) Motoneuron." *European Journal of Neuroscience* 15(3): p429–38. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.0953-816x.2001.01863.x>.
- Cahill Matthew et al. 1996. "Baseline Determination and Detection of Resistance to Imidacloprid in *Bemisia Tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae)." *Bulletin of Entomological Research* 86(4): p343–49.
- Calas-List Delphine, List Olivier, Quinchart Sophie and Thany S.H. 2013. "Calcium Pathways Such as CAMP Modulate Clothianidin Action through Activation of α -Bungarotoxin-Sensitive and -Insensitive Nicotinic Acetylcholine Receptors." *NeuroToxicology* 37: p127–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2013.04.011>.
- Calas-List Delphine, List Olivier and Thany S.H. 2012. "Nornicotine Application on Cockroach Dorsal Unpaired Median Neurons Induces Two Distinct Ionic Currents: Implications of Different Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Neuroscience Letters* 518(1): p64–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2012.04.058>.
- Cartaud Jean, Benedetti E Lucia, and Cohen B. 1973. "Presence of a Lattice Structure in Membrane Fragments Rich in Nicotinic Receptor Protein from the Electric Organ of *Torpedo Marmorata*." 33(1): p109–13.
- Cartreau, Alison et al. 2020. "Cloning and Expression of Cockroach A7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit." *Frontiers in Physiology* 11(May): p1–10.
- Casida John E and Durkin Kathleen A. 2013. "Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects." *Annual Review of Entomology* 58(1): p99–117. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-120811-153645>.
- Casida John E. 2018. "Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators: Progress and Prospects." *Annual Review of Entomology*. <http://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043042>.
- Celie Patrick H.N. et al. 2004. "Nicotine and Carbamylcholine Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors as Studied in AChBP Crystal Structures." *Neuron* 41(6): 907–14.

Bibliographie

- Chamaon Kathrin et al. 2000. "Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors of *Drosophila Melanogaster*: The α -Subunit $\alpha 3$ and the β -Type Subunit $\beta 1$ Co-Assemble within the Same Receptor Complex." *FEBS Letters* 482(3): p189–92.
- Chamaon Kathrin, Smalla K-H, Thomas Ulrich and Gundelfinger Eckart D. 2002. "Nicotinic Acetylcholine Receptors of *Drosophila*: Three Subunits Encoded by Genomically Linked Genes Can Co-Assemble into the Same Receptor Complex." *Journal of Neurochemistry* 80(1): p149–57. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.0022-3042.2001.00685.x> (May 6, 2020).
- Changeux J-P, Kasai Michiki and Lee C.Y. 1970. "Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 67(3): p1241–47.
- Changeux J-P. 2018. "The Nicotinic Acetylcholine Receptor: A Typical 'Allosteric Machine.'" *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373(1749).
- Changeux J-P. 2020. "Discovery of the First Neurotransmitter Receptor: The Acetylcholine Nicotinic Receptor." *Biomolecules* 10(4).
- Changeux J-P and Edelstein S.J. 1998. "Allosteric Receptors after 30 Years." *Neuron* 21(5): p959–80.
- Charles J-P et al. 1992. "cDNA Cloning and Deduced Amino Acid Sequence of a Major, Glycine-Rich Cuticular Protein from the Coleopteran *Tenebrio Molitor*. Temporal and Spatial Distribution of the Transcript during Metamorphosis." *European journal of biochemistry* 206(3): p813–19. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16989.x>.
- Chatzidaki Anna, and Millar N.S. 2015. "Allosteric Modulation of Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Biochemical Pharmacology* 97(4): p408–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.028>.
- Chen Shun et al. 2013. "Advances with RNA Interference in Alzheimer's Disease Research." *Drug Design, Development and Therapy* 7: p117–25.
- Chen Xuewei et al. 2017. "Both Point Mutations and Low Expression Levels of the Nicotinic Acetylcholine Receptor $\beta 1$ Subunit Are Associated with Imidacloprid Resistance in an *Aphis Gossypii* (Glover) Population from a Bt Cotton Field in China." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 141: p1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.11.004>.
- Christen Verena and Fent Karl. 2017. "Exposure of Honey Bees (*Apis Mellifera*) to Different Classes of Insecticides Exhibit Distinct Molecular Effect Patterns at Concentrations That Mimic Environmental Contamination." *Environmental Pollution* 226: p48–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.003>.
- Christen Verena, Schirrmann Melanie, Frey Juerg E and Fent Karl. 2018. "Global Transcriptomic Effects of Environmentally Relevant Concentrations of the Neonicotinoids Clothianidin, Imidacloprid, and Thiamethoxam in the Brain of Honey Bees (*Apis Mellifera*)." *Environmental Science and Technology* 52(13): p7534–44.
- Christiaens Olivier et al. 2016. "RNA Interference: A Promising Biopesticide Strategy against the African Sweetpotato Weevil *Cylas Brunneus*." *Scientific Reports* 6(November): p1–11.
- Cutler G. Christopher and Guedes Raul N.C. 2017. "Occurrence and Significance of Insecticide-Induced Hormesis in Insects." *ACS Symposium Series* 1249: p101–19.
- Cleland Thomas A. 1996. "Inhibitory Glutamate Receptor Channels." *Molecular Neurobiology* 13(2): p97–136. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8938647> (May 5, 2020).
- Collingridge Graham L, Olsen Richard W, Peters John and Spedding Michael. 2009. "A Nomenclature for Ligand-Gated Ion Channels." *Neuropharmacology* 56(1): p2–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.063>.
- Commission Européenne. 2015. (Revised) Directive 98/8/EC Concerning the Placing of Biocidal Products on the Market ; Imidacloprid; Product-Type 18 (Insecticide, Acaricide and Product to Control Other Arthropods) : Assessment Report.
- Conroy William G, Vernallis Ann B and Berg Darwin K. 1992. "The $\alpha 5$ Gene Product Assembles with Multiple Acetylcholine Receptor Subunits to Form Distinctive Receptor Subtypes in Brain." *Neuron* 9(4): p679–91.
- Cordero-Erausquin Matilde, Marubio Lisa M, Klink Ruby and Changeux J-P. 2000. "Nicotinic Receptor Function : New Perspectives from Knockout Mice." 21(June): p211–17.
- Cordova Daniel et al. 2016. "Mode of Action of Triflumezopyrim: A Novel Mesoionic Insecticide Which Inhibits the Nicotinic Acetylcholine Receptor." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 74: p32–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.04.008>.
- Corringer P-J et al. 1995. "Identification of a New Component of the Agonist Binding Site of the Nicotinic $\alpha 7$ Homooligomeric Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 270(20): p11749–52.
- Courjaret R, and Lapied B. 2001. "Complex Intracellular Messenger Pathways Regulate One Type of Neuronal α -Bungarotoxin-Resistant Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in Insect Neurosecretory Cells (Dorsal Unpaired Median Neurons)." *Molecular pharmacology* 60(1): p80–91.
- Courjaret Raphaël, Grolleau Françoise and Lapied Bruno. 2003. "Two Distinct Calcium-Sensitive and -Insensitive PKC up- and down-Regulate an α -Bungarotoxin-Resistant NACHR1 in Insect Neurosecretory Cells (DUM Neurons)." *European Journal of Neuroscience* 17(10): p2023–34.
- Couturier Sabine et al. 1990. "A Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit ($\alpha 7$) Is Developmentally Regulated and Forms a Homo-Oligomeric Channel Blocked by α -BTX." *Neuron* 5(6): p847–56.
- Cox Caroline. 2001. "Insecticide Factsheet : Imidacloprid." In *Journal of Pesticide Reform*, p15–21.

Bibliographie

- Crespi Arianna, Colombo Sara Francesca and Gotti Cecilia. 2018. "Proteins and Chemical Chaperones Involved in Neuronal Nicotinic Receptor Expression and Function: An Update." *British Journal of Pharmacology* 175(11): p1869–79.
- Crossthwaite Andrew J et al. 2017. "The Invertebrate Pharmacology of Insecticides Acting at Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Journal of Pesticide Science* 42(3): p67–83.
- Cutler Penny et al. 2013. "Investigating the Mode of Action of Sulfoxaflor: A Fourth-Generation Neonicotinoid." *Pest Management Science* 69(5): p607–19.
- Czajkowski C, Kaufmann C and Karlin A. 1993. "Negatively Charged Amino Acid Residues in the Nicotinic Receptor δ Subunit That Contribute to the Binding of Acetylcholine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(13): p6285–89.
- D'Urso Agustina and Brickner Jason H. 2017. "Epigenetic Transcriptional Memory." *Current Genetics* 63(3): p435–39. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416312148>.
- Daborn P.J et al. 2002. "A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in *Drosophila*." *Science* 297(5590): p2253–56. <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1074170>.
- Daborn P.J et al. 2012. "Using *Drosophila Melanogaster* to Validate Metabolism-Based Insecticide Resistance from Insect Pests." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42(12): p918–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.09.003>.
- Dale H.H, Feldberg W and Vogt M. 1936. "Release of Acetylcholine at Voluntary Motor Nerve Endings." *The Journal of Physiology* 86(4): p353–80. <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1936.sp003371> (May 4, 2020).
- Dale H.H. and Gasser H.S. 1926. "The Pharmacology Of Denervated Mammalian Muscle Part I. The Nature Of The Substances Producing Contracture." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 29(1).
- Dale H.H. 1914. "The Action of Certain Esters and Ethers of Choline, and Their Relation to Muscarine." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 6(2): p147–90. <https://www.scienceopen.com/document?vid=2f231d1b-6c83-4e7d-988f-875c329bc9df>.
- Dale R.P et al. 2010. "Identification of Ion Channel Genes in the *Acyrtosiphon Pisum* Genome." *Insect Molecular Biology* 19(SUPPL. 2): p141–53.
- Dani John A. 2015. 124 International Review of Neurobiology Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. 1st ed. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.irn.2015.07.001>.
- Darriet Frédéric. 1998. *La Lutte Contre Les Moustiques Nuisants et Vecteurs de Maladies : L'évaluation de Nouveaux Insecticides Utilisables Contre Les Moustiques En Afrique Tropicale*. ed. Karthala. Paris: ORSTOM.
- Deglise Patrice and Grünewald Bernd. 2002. "The Insecticide Imidacloprid Is a Partial Agonist of the Nicotinic Receptor of Honeybee Kenyon Cells." 321: p13–16.
- Denholm I et al. 2002. "Insecticide Resistance on the Move.", *Science* 297;2222 : 2p.
- Dennis Michael et al. 1988. "Amino Acids of the Torpedo Marmorata Acetylcholine Receptor α Subunit Labeled by a Photoaffinity Ligand for the Acetylcholine Binding Site." *Biochemistry* 27(7): p2346–57.
- Denzler Rémy et al. 2016. "Impact of MicroRNA Levels, Target-Site Complementarity, and Cooperativity on Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression." *Molecular Cell* 64(3): p565–79.
- Després Laurence, David J-P and Gallet Christiane. 2007. "The Evolutionary Ecology of Insect Resistance to Plant Chemicals." *Trends in Ecology and Evolution* 22(6): p298–307.
- Dougherty Dennis A. 2013. "The Cation- π Interaction." *Accounts of Chemical Research* 46(4): p885–93.
- Dudai Yadin. 1978. "Properties of an α -bungarotoxin-binding cholinergic nicotinic receptor from *Drosophila melanogaster*." *Biochimica et Biophysica Acta* 539(10): p505–17.
- Dupuis Julien, Louis Thierry, Gauthier Monique and Raymond Valérie. 2012. "Insights from Honeybee (*Apis Mellifera*) and Fly (*Drosophila Melanogaster*) Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Genes to Behavioral Functions." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36(6): 1553–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.04.003>.
- Dupuis Julien Pierre, Gauthier Monique and Raymond-Delpech Valérie. 2011. "Expression Patterns of Nicotinic Subunits $\alpha 2$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, and $\beta 1$ Affect the Kinetics and Pharmacology of ACh-Induced Currents in Adult Bee Olfactory Neuropiles." *J. Neurophysiol* : 2011 (106): p1604–13.
- Edelstein Stuart J et al. 1996. "A Kinetic Mechanism for Nicotinic Acetylcholine Receptors Based on Multiple Allosteric Transitions." *Biological Cybernetics* 75(5): p361–79.
- Elgoyhen Ana B et al. 1994. 79 Cell A9: An Acetylcholine Receptor with Novel Pharmacological in Rat Cochlear Hair Cells Properties Expressed.
- Ellis Daniel S et al. 2018. "A 50-Year Retrospective of Persistent Organic Pollutants in the Fat and Eggs of Penguins of the Southern Ocean." *Environmental Pollution* 241: p155–63. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749118300046> (June 4, 2020).
- Elzaki Mohammed Esmail Abdalla et al. 2016. "Constitutive Overexpression of Cytochrome P450 Associated with Imidacloprid Resistance in *Laodelphax Striatellus* (Fallén)." *Pest Management Science* 72(5): p1051–58. <http://doi.wiley.com/10.1002/ps.4155>.
- Enayati A.A, Ranson H and Hemingway J. 2005. "Insect Glutathione Transferases and Insecticide Resistance." 14: p3–8.
- Enz John W and Hofman Vernon. 2017. "Air Temperature Inversions Causes , Characteristics and Potential Effects on Pesticide Spray Drift." 1705(April

Bibliographie

- 2014): p1–16.
- European Food Safety Authority. 2013. "Conclusion on the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment for Bees for the Active Substance Imidacloprid." *EFSA Journal* 11(1): 3068. <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2013.3068>.
- Ewins A.J. 1914. "Acetylcholine, a New Active Principle of Ergot." *Biochemical Journal* 8(1): p44–49. <https://portlandpress.com/biochemj/article/8/1/44/50804/Acetylcholine-a-New-Active-Principle-of-Ergot>.
- Fang Y et al. 2015. "Two New Types of Allergens from the Cockroach, *Periplaneta Americana*." *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 70(12): p1674–78.
- Farooqui Tahira. 2012. "Review of Octopamine in Insect Nervous Systems." *Open Access Insect Physiology*: 1.
- Fayyazuddin Amir, Zaheer Mahira A, Hiesinger Robin P, and Bellen Hugo J. 2006. "The Nicotinic Acetylcholine Receptor D α 7 Is Required for an Escape Behavior In *Drosophila*" ed. Barry Dickson. *PLoS Biology* 4(3): e63. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0040063>.
- Feltham Hannah, Park Kirsty and Goulson Dave. 2014. "Field Realistic Doses of Pesticide Imidacloprid Reduce Bumblebee Pollen Foraging Efficiency." *Ecotoxicology* 23(3): p317–23.
- Feng Yuntao et al. 2010. "Cross-Resistance Study and Biochemical Mechanisms of Thiamethoxam Resistance in b-Biotype *Bemisia Tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)." *Pest Management Science* 66(3): p313–18.
- Field M. Linda and Devonshire L. Alan. 1998. "Evidence That the E4 and FE4 Esterase Genes Responsible for Insecticide Resistance in the Aphid *Myzus Persicae* (Sulzer) Are Part of a Gene Family." *Biochemical Journal* 330(1): p169–73. <https://portlandpress.com/biochemj/article/330/1/169/36878/Evidence-that-the-E4-and-FE4-esterase-genes>.
- Fisher Stephen K. and Wonnacott Susan. 2012. "Acetylcholine." *Basic Neurochemistry, Eight Edition, Chapter 13*: p258–282. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749475000134>.
- Fnu Sheema et al. 2011. "Methylation of Histone H3 Lysine 36 Enhances DNA Repair by Nonhomologous End-Joining." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(2): p540–45.
- Food European and Safety Authority. 2018. "Peer Review of the Pesticide Risk Assessment for Bees for the Active Substance Imidacloprid Considering the Uses as Seed Treatments and Granules." *EFSA Journal* 16(2).
- Franklin R.E and Gosling R.G. 1953. "The Structure of Sodium Thymonucleate Fibres. I. The Influence of Water Content." *Acta Crystallographica* 6(8): p673–77.
- Fye W. Bruce. 2006. "2006 Zimmer Otto Loewi Experiment Clin Cardiol." *Clin. Cardiol.* 29: p135–36.
- Galzi J-L, Revah F, Bouet F, et al. 1991. "Allosteric Transitions of the Acetylcholine Receptor Probed at the Amino Acid Level with a Photolabile Cholinergic Ligand." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(11): p5051–55.
- Galzi J-L and Changeux J-P. 1995. "Neuronal Nicotinic Receptors: Molecular Organization and Regulations." *Neuropharmacology* 34(6): p563–82.
- Galzi J-L, Revah F, Bessis A, and Changeux J-P. 1991. "Functional Architecture of the Nicotinic Acetylcholine Receptor: From Electric Organ to Brain." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 31: p37–72.
- Galzi J-L et al. 1990. "Identification of a Novel Amino Acid Alpha-Tyrosine 93 within the Cholinergic Ligands-Binding Sites of the Acetylcholine Receptor by Photoaffinity Labeling. Additional Evidence for a Three-Loop Model of the Cholinergic Ligands-Binding Sites." *Journal of Biological Chemistry* 265(16): p10430–37.
- Gao Jian-rong, Deacutis Juliane M and Scott Jeffrey G. 2007. "Characterization of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Gene *Mda2* from the House Fly, *Musca Domestica*." *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 64(1): 30–42. <http://doi.wiley.com/10.1002/arch.20158>.
- Garcia Alphonse et al. 2003. "Serine/Threonine Protein Phosphatases PP1 and PP2A Are Key Players in Apoptosis." *Biochimie* 85(8): p721–26. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908403001500>.
- Garcia Lindsay. 2017. "American Cockroaches, Racism, and the Ecology of the Slave Ship." *Environment & Society Portal, Arcadia* 29(Rachel Carson Center for Environment and Society): 7.
- Gasser H.S, and Dale H.H. 1926. "The Pharmacology Of Denervated Mammalian Muscle II. Some Phenomena Of Antagonism, And The Formation Of Lactic Acid In Chemical Contracture." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 28(2).
- Gasteiger Elisabeth et al. 2003. "ExpASY: The Proteomics Server for in-Depth Protein Knowledge and Analysis." *Nucleic Acids Research* 31(13): p3784–88.
- Gauthier Monique et al. 2006. "Involvement of α -Bungarotoxin-Sensitive Nicotinic Receptors in Long-Term Memory Formation in the Honeybee (*Apis Mellifera*)." *Neurobiology of Learning and Memory* 86(2): p164–74.
- Georghiou George P. 1990. "Overview of Insecticide Resistance." In *Managing Resistance to Agrochemicals - Chapter 2* - p18–41. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1990-0421.ch002>.
- Gervais J.A, Stone D, Luukinen B and Buhl K. 2010. "Imidacloprid Technical Fact Sheet." National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services: p1–14. <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/imidacloprid.html>.
- Gill-Thind JasKiran K. et al. 2015. "Structurally Similar Allosteric Modulators of A7 Nicotinic Acetylcholine Receptors Exhibit Five Distinct Pharmacological Effects." *Journal of Biological Chemistry* 290(6): p3552–62.

Bibliographie

- Giraudat J, and Changeux J-P. 1982. "Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor.", *The EMBO Journal* Vol.1 (6) : p713–17.
- Gisselmann G, Pusch H, Hovemann B.T and Hatt H. 2002. "Two CDNAS Coding for Histamine-Gated Ion Channels in *D. Melanogaster*." *Nature Neuroscience* 5(1): p11–12.
- Goldberg Frank, Grünewald Bernd, Rosenboom Hendrik and Menzel Randolph. 1999. "Nicotinic Acetylcholine Currents of Cultured Kenyon Cells from the Mushroom Bodies of the Honey Bee *Apis Mellifera*." *Journal of Physiology* 514(3): p759–68.
- Goodman Corey S. 1982. "Embryonic Development of Identified Neurons in the Grasshopper." *Neuronal Development*: p171–212.
- Gotti C et al. 1994. "Pharmacology and Biophysical Properties of $\alpha 7$ and $\alpha 7$ - $\alpha 8$ α -Bungarotoxin Receptor Subtypes Immunopurified from the Chick Optic Lobe." *European Journal of Neuroscience* 6(8): p1281–91.
- Goulson Dave. 2013. "REVIEW: An Overview of the Environmental Risks Posed by Neonicotinoid Insecticides" ed. David Kleijn. *Journal of Applied Ecology* 50(4): p977–87. <http://doi.wiley.com/10.1111/1365-2664.12111>.
- Grabherr Manfred G. et al. 2011. "Full-Length Transcriptome Assembly from RNA-Seq Data without a Reference Genome." *Nature biotechnology* 29(7): p644–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572440>.
- Grauso M, Reenan R.A, Culetto E and Sattelle D.B. 2002. "Novel Putative Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Genes, Dalpha5, Dalpha6 and Dalpha7, in *Drosophila Melanogaster* Identify a New and Highly Conserved Target of Adenosine Deaminase Acting on RNA-Mediated A-to-I Pre-mRNA Editing." *Genetics* 160(April): p1519–33.
- Green William N, and Wanamaker Christian P. 1997. "The Role of the Cystine Loop in Acetylcholine Receptor Assembly." *Journal of Biological Chemistry* 272(33): p20945–53.
- Greenwood R, Ford M.G and Scarr A. 2002. "Neonicotinoid Pharmacokinetics." In the BCPC Conference: Pests and diseases, Volumes 1 and 2. Proceedings of an international conference held at the Brighton Hilton Metropole Hotel, Brighton, UK, 18-21 November 2002 2002 pp.153-160 ref.8In , p153–60.
- Grolleau Françoise and Lapied Bruno. 2000. "Dorsal Unpaired Median Neurones in the Insect Central Nervous System: Towards a Better Understanding of the Ionic Mechanisms Underlying Spontaneous Electrical Activity." *J Exp.Biol.* 203 Pt 11: p1633–48. <http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=MDLN.20266011>.
- Gu Huaiyu and O'Dowd Diane K. 2006. "Cholinergic Synaptic Transmission in Adult *Drosophila* Kenyon Cells in Situ." *Journal of Neuroscience* 26(1): 265–72.
- Guedes Raul Narciso C, Walse Spencer S and Throne James E. 2017. "Sublethal Exposure, Insecticide Resistance, and Community Stress." *Current Opinion in Insect Science* 21: p47–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.010>.
- Guo Beina et al. 2015. "Identification of Key Amino Acid Differences between *Cyrtorhinus lividipennis* and *Nilaparvata lugens* NACHR A8 Subunits Contributing to Neonicotinoid Sensitivity." *Neuroscience Letters* 589: p163–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.046>.
- Hall L.M and Teng N.N.H. 1975. "Localization of Acetylcholine Receptors in *Drosophila Melanogaster*." *Developmental Biology-Pattern Formation-Gene*, (MCMAHON D. & Fox C. F., eds.), Benjamin, Menlo Park, CA: p282-289. Benjamin, MenloPark, CA.
- Hall Thomas A. 1999. "BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT." *Nucleic Acids Symposium* 41: p95–98. <http://xlink.rsc.org/?DOI=C7QI00394C>.
- Helfrich-Förster Charlotte. 2018. "Sleep in Insects." *Annual Review of Entomology* 63: p69–86. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-020117-043201>.
- Hemingway Janet and Ranson Hilary. 2000. "Insecticide Resistance in Insect Vectors." *Annu. Rev. Entomol.*: p371–91.
- Hermans-Borgmeyer Irmgard et al. 1986. "Primary Structure of a Developmentally Regulated Nicotinic Acetylcholine Receptor Protein from *Drosophila*." *The EMBO Journal* 5(7): p1503–8.
- Herzig Stefan and Neumann Joachim. 2000. "Effects of Serine/Threonine Protein Phosphatases on Ion Channels in Excitable Membranes." *Physiological Reviews* 80(1): p173–210. <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2000.80.1.173>.
- Hikida Mai et al. 2018. "Combined Effects of Mutations in Loop C and the Loop D-E-G Triangle on Neonicotinoid Interactions with *Drosophila* D α 1/Chicken B2 Hybrid NACHRs." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 151(March): p47–52. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.03.008>.
- Hirata Koichi et al. 2017. "The R81T Mutation in the Nicotinic Acetylcholine Receptor of *Aphis gossypii* Is Associated with Neonicotinoid Insecticide Resistance with Differential Effects for Cyano- and Nitro-Substituted Neonicotinoids." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 143(August): p57–65. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.09.009>.
- Holyoke Caleb W. et al. 2015. "Triflumezopyrim: Discovery and Optimization of a Mesoionic Insecticide for Rice." *ACS Symposium Series* 1204: p365–78.
- Hooper G.H.S. 1968. "A Review of the Problem of Insecticide Resistance in Australia." *Australian Journal of Entomology* 7(1): p67–76.
- Horiuchi Yoko et al. 2003. "Evolutional Study on Acetylcholine Expression." 72: p1745–56.
- Hu Yee Tung et al. 2017. "Regulation of Genes Related to Immune Signaling and Detoxification in *Apis Mellifera* by an Inhibitor of Histone Deacetylation." *Scientific Reports* 7(June 2016): 1–14. <http://dx.doi.org/10.1038/srep41255>.

Bibliographie

- Huang J.H, Liu Y, Lin Y.H, Belles X, Lee H.J. "Practical Use of RNA Interference: Oral Delivery of Double-stranded RNA in Liposome Carriers for Cockroaches". *J. Vis. Exp.* (135),doi:10.3791/57385 (2018).
- Huang Yao et al. 1999. "Molecular Characterization and Imidacloprid Selectivity of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits from the Peach-Potato Aphid *Myzus Persicae*." *Journal of Neurochemistry* 73(1): p380–89.
- Huang Yao. 2000. "Cloning, Heterologous Expression and Co-Assembly of M β 1, a Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit from the Aphid *Myzus Persicae*." *Neuroscience Letters* 284(1–2): p116–20.
- Hue B and Callec J-J. 1990. "Cockroaches as Models for Neurobiology: Applications in Biomedical Research Electrophysiology and Pharmacology of Synaptic Transmission in the Central Nervous System of the Cockroach" eds. I. Huber, E.P. Masler, A. Asidi, and B.R Rao. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.
- Huganir Richard L and Greengardt Paul. 1990. "Regulation of Neurotransmitter Receptor Desensitization by Protein Phosphorylation." *Neuron* 5(5): p555–67.
- IARC. 2015. 112 IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; Volume 112 Some Organophosphate Insecticides and Herbicides. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/mono112.pdf> (May 4, 2020).
- Ihara Makoto et al. 2018. "Loops D, E and G in the *Drosophila* D α 1 Subunit Contribute to High Neonicotinoid Sensitivity of D α 1-Chicken B2 Nicotinic Acetylcholine Receptor." *British Journal of Pharmacology* 175(11).
- Ihara Makoto et al. 2020. "Cofactor-Enabled Functional Expression of Fruit Fly, Honeybee, and Bumblebee Nicotinic Receptors Reveals Picomolar Neonicotinoid Actions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: p1–9.
- Ihara Makoto, Sattelle D.B and Matsuda Kazuhiko. 2015. "Probing New Components (Loop G and the α - α Interface) of Neonicotinoid Binding Sites on Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121: p47–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.02.011>.
- Illumina. 2017. *TruSeq Stranded MRNA : Reference Guide (1000000040498)*.
- INERIS. 2011. "Imidaclopride – N° Cas 138261-41-3." INERIS : Norme de qualité environnementale: 21p.
- INRS. 2015. *Imidaclopride Propriétés Physiques Pathologie - Toxicologie*.
- Insecticide Resistance Action Committee | IRAC. <https://irac-online.org/> (April 26, 2020).
- Itier Valérie and Bertrand Daniel. 2001. "Neuronal Nicotinic Receptors: From Protein Structure to Function." *FEBS Letters* 504(3): p118–25.
- Jensen Marianne L., Schousboe Arne and. Ahring Philip K. 2005. "Charge Selectivity of the Cys-Loop Family of Ligand-Gated Ion Channels." *Journal of Neurochemistry* 92(2): p217–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15663470> (May 6, 2020).
- Jeschke Peter et al. 2015. "Flupyradifurone (Sivanto™) and Its Novel Butenolide Pharmacophore: Structural Considerations." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121: p31–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.10.011>.
- Jeschke Peter, Nauen Ralf, Schindler Michael and Elbert Alfred. 2011. "Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids (Dagger)." *Journal of agricultural and food chemistry* (July): p1–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20567858>.
- Jiao Yu et al. 2019. "Massive Expansion and Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Lophotrochozoans." *BMC Genomics* 20(1): p1–15.
- Jin Yongfeng et al. 2007. "RNA Editing and Alternative Splicing of the Insect NACHR Subunit Alpha6 Transcript: Evolutionary Conservation, Divergence and Regulation." *BMC Evolutionary Biology* 7: p1–12.
- Jonas Petra, Baumann Arnd, Merz Barbara and Gundelfinger Eckart D. 1990. "Structure and Developmental Expression of the D α 2 Gene Encoding a Novel Nicotinic Acetylcholine Receptor Protein of *Drosophila Melanogaster*." *FEBS Letters* 269(1): p264–68.
- Jones Andrew K et al. 2006. "The Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family of the Honey Bee, *Apis Mellifera*." *Genome Research* 16(11): p1422–30.
- Jones Andrew K, Buckingham S.D and Sattelle D.B. 2010. "Proteins Interacting with Nicotinic Acetylcholine Receptors: Expanding Functional and Therapeutic Horizons." *Trends in Pharmacological Sciences* 31(10): p455–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2010.07.001>.
- Jones Andrew K and Sattelle D.B. 2004. "Functional Genomics of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family of the Nematode, *Caenorhabditis Elegans*." *BioEssays* 26(1): p39–49.
- Jones Andrew K, Grauso Marta and Sattelle D.B. 2005. "The Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family of the Malaria Mosquito, *Anopheles Gambiae*." *Genomics* 85(2): p176–87.
- Jones Andrew K and Sattelle D.B. 2010. "Diversity of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits." *Advances in experimental medicine and biology* 683: p25–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20737786>.
- Jones Andrew K and Sattelle D.B. 2007. "The Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channel Gene Superfamily of the Red Flour Beetle, *Tribolium Castaneum*" *BMC Genomics* 8(327): p1–16.
- Kagabu Shinzo. 2011. "Discovery of Imidacloprid and Further Developments from Strategic Molecular Designs." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(7): p2887–96.
- Kaltenegger Elisabeth et al. 2003. "Insecticidal Pyrido[1,2-a]Azepine Alkaloids and Related Derivatives from *Stemona* Species." *Phytochemistry* 63(7): p803–16.

Bibliographie

- Kambhampati Srinivas. 1995. "A Phylogeny of Cockroaches and Related Insects Based on DNA Sequence of Mitochondrial Ribosomal RNA Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(6): p2017–20.
- Kamimura Hideo and Yamamoto Izuru . 1963. "Studies on Nicotinoids as Insecticides Part III Structure of Anabaseine." *Agr. Biol. Chem.* 27(6): p1959–62.
- Kane Nanci S et al. 2000. "Drug-Resistant *Drosophila* Indicate Glutamate-Gated Chloride Channels Are Targets for the Antiparasitics Nodulisporic Acid and Ivermectin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25): p13949–54.
- Kang Zhi-Wei et al. 2018. "Effect of Sublethal Doses of Imidacloprid on the Biological Performance of Aphid Endoparasitoid *Aphidius Gifuensis* (Hymenoptera: Aphidiidae) and Influence on Its Related Gene Expression." *Frontiers in Physiology* 9(December): p1–15. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.01729/full>.
- Kao P.N and Karlin A. 1986. "Acetylcholine Receptor Binding Site Contains a Disulfide Cross-Link between Adjacent Half-Cystinyl Residues." *Journal of Biological Chemistry* 261(18): p8085–88.
- Kehoe Jac Sue and McIntosh J. Michael. 1998. "Two Distinct Nicotinic Receptors, One Pharmacologically Similar to the Vertebrate A7-Containing Receptor, Mediate Cl Currents in *Aplysia* Neurons." *Journal of Neuroscience* 18(20): p8198–8213.
- Kessler Sébastien C et al. 2015. "Bees Prefer Foods Containing Neonicotinoid Pesticides." *Nature* 521(7550): p74–76.
- Keyser K.T et al. 1993. "Three Subtypes of α -Bungarotoxin-Sensitive Nicotinic Acetylcholine Receptors Are Expressed in Chick Retina." *Journal of Neuroscience* 13(2): p442–54.
- Koo Hyun Na et al. 2014. "Regional Susceptibilities to 12 Insecticides of Melon and Cotton Aphid, *Aphis Gossypii* (Hemiptera: Aphididae) and a Point Mutation Associated with Imidacloprid Resistance." *Crop Protection* 55: 91–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.09.010>.
- Krohn J and Hellpointner E. 2003. "Environmental Fate of Imidacloprid." *Pflanzenschutz- Nachrichten Bayer* 55: p1–25
- Lalonde D.I.V and Brown A.W.A. 1954. "The Effect of Insecticides on the Action Potentials of Insect Nerve." *Canadian Journal of Zoology* 32(2): p74–81.
- Lalouette Lisa et al. 2016. "Unexpected Effects of Sublethal Doses of Insecticide on the Peripheral Olfactory Response and Sexual Behavior in a Pest Insect." *Environmental Science and Pollution Research* 23(4): p3073–85.
- Lane N.J, Swales L.S, David J.A and Sattelle D.B. 1982. "Differential Accessibility to Two Insect Neurones Do Not Account for Differences in Sensitivity to α -Bungarotoxin." *Tissue and Cell* 14(3): p489–500.
- Langley J. N. 1907. "On the Contraction of Muscle, Chiefly in Relation to the Presence of 'Receptive' Substances." *The Journal of Physiology* 36(4–5): 347–84. <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1907.sp001236> (May 4, 2020).
- Lansdell S.J and Millar N.S. 2000. "The Influence of Nicotinic Receptor Subunit Composition upon Agonist, Alpha-Bungarotoxin and Insecticide (Imidacloprid) Binding Affinity." *Neuropharmacology* 39(4): p671–79.
- Lansdell S.J et al. 2008. "Host-Cell Specific Effects of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Chaperone RIC-3 Revealed by a Comparison of Human and *Drosophila* RIC-3 Homologues." *Journal of Neurochemistry* 105(5): p1573–81.
- Lansdell S.J, Collins Toby, Goodchild Jim and Millar N.S. 2012. "The *Drosophila* Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits D α 5 and D α 7 Form Functional Homomeric and Heteromeric Ion Channels." *BMC Neuroscience* 13(1): 73p.
- Lansdell S.J and Millar N.S. 2002. "D β 3, an Atypical Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit from *Drosophila*: Molecular Cloning, Heterologous Expression and Coassembly." *Journal of Neurochemistry* 80(6): p1009–18. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.0022-3042.2002.00789.x> (May 6, 2020).
- Lansdell S.J et al. 2005. "RIC-3 Enhances Functional Expression of Multiple Nicotinic Acetylcholine Receptor Subtypes in Mammalian Cells." *Mol Pharmacol* 68(5): p1431–38.
- Lansdell S.J and Millar N.S. 2000. "Cloning and Heterologous Expression of D α 4, a *Drosophila* Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit: Identification of an Alternative Exon Influencing the Efficiency of Subunit Assembly." *Neuropharmacology* 39(13): p2604–14.
- Larkin M.A et al. 2007. "Clustal W and Clustal X Version 2.0." *Bioinformatics* 23(21): p2947–48.
- Laurent François M and Rathahao Estelle. 2003. "Distribution of [¹⁴C]Imidacloprid in Sunflowers (*Helianthus Annuus* L.) Following Seed Treatment." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(27): p8005–10.
- Lee Suk Hee et al. 2005. "The SET Domain Protein Metnase Mediates Foreign DNA Integration and Links Integration to Nonhomologous End-Joining Repair." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(50): 18075–80.
- Léna Clément and Changeux J-P. 1993. "Allosteric Modulations of the Nicotinic Acetylcholine Receptor." : p181–86.
- Leßmann V and Dietzel I.D. 1995. "Two Kinetically Distinct 5-Hydroxytryptamine-Activated Cl⁻ Conductances at Retzius P-Cell Synapses of the Medicinal Leech." *Journal of Neuroscience* 15(2): p1496–1505.
- Li Jian et al. 2010. "Native Subunit Composition of Two Insect Nicotinic Receptor Subtypes with Differing Affinities for the Insecticide Imidacloprid." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40(1): p17–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.12.003>.
- Li Liang et al. 2015. "Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase (MAPKKK) 4 from Rapeseed (*Brassica Napus* L.) Is a Novel Member Inducing ROS Accumulation and Cell Death." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467(4): p792–97.

Bibliographie

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.063>.

- Li Sheng et al. 2018. "The Genomic and Functional Landscapes of Developmental Plasticity in the American Cockroach." *Nature Communications* 9(1): 1008. <http://www.nature.com/articles/s41467-018-03281-1>.
- Li Xianchun, Mary A. Schuler, and May R. Berenbaum. 2007. "Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics." *Annual Review of Entomology* 52(1): p231–53. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>.
- Liao Xun et al. 2020. "Current Susceptibilities of Brown Planthopper Nilaparvata Lugens to Triflumezopyrim and Other Frequently Used Insecticides in China." *Insect Science*: p1–12.
- Ligonniere Sébastien. 2020. Etude de l'implication de La Sous-Unité Nicotinique $\alpha 7$ Dans La Sensibilité de a Blatte à l'imidaclopride. Rapport de stage de M2 réalisé à l'Université d'Angers en Juin 2020, sous la direction de Valérie Raymond et Delphine Goven au sein du SIFCIR
- Lind Robert J, Clough M.S, Reynolds S.E, and Earley F.G.P. 1998. "[3H]Imidacloprid Labels High- and Low-Affinity Nicotinic Acetylcholine Receptor-like Binding Sites in the Aphid Myzus Persicae (Hemiptera: Aphididae)." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 62(1): p3–14.
- Lindstrom Jon, Yogeewaran Ganesa and Merlie John. 1979. "Biochemical Properties of Acetylcholine Receptor Subunits from Torpedo Calif or Nica." *Biochemistry* 18(21): p4465–70.
- Liska De Ann J. 1998. "The Detoxification Enzyme Systems." *Alternative Medicine Review* 3(3): p187–98.
- List Olivier et al. 2014. "Inhibition of PaCaMKII-E Isoform in the Dorsal Unpaired Median Neurosecretory Cells of Cockroach Reduces Nicotine- and Clothianidin-Induced Currents." *Journal of Neurochemistry* 130(4): p507–13.
- Liu Yi Peng et al. 2013. "Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family of the Pea Aphid, Acyrthosiphon Pisum." *Journal of Integrative Agriculture* 12(11): p2083–91.
- Liu Zewen et al. 2005. "A Nicotinic Acetylcholine Receptor Mutation Conferring Target-Site Resistance to Imidacloprid in Nilaparvata Lugens (Brown Planthopper)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(24): p8420–25.
- Liu Zewen et al. 2006. "A Nicotinic Acetylcholine Receptor Mutation (Y151S) Causes Reduced Agonist Potency to a Range of Neonicotinoid Insecticides." *Journal of Neurochemistry* 99(4): p1273–81.
- Liu Zewen et al. 2009. "Identification of Two Lynx Proteins in Nilaparvata Lugens and the Modulation on Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Journal of Neurochemistry* 110(5): p1707–14. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2008.05790.x>.
- Lo Nathan et al. 2000. "Evidence from Multiple Gene Sequences Indicates That Termites Evolved from Wood-Feeding Cockroaches." *Current Biology* 10(13): p801–4.
- Loewi O. 1921. "Über Humorale Übertragbarkeit Der Herznervenwirkung.I.Mitteilung." *Pflügers Arch Ges Physiol* 189: p239–42.
- Ma Kangsheng et al. 2019. "Overexpression of Multiple Cytochrome P450 Genes Associated with Sulfoxaflor Resistance in Aphis Gossypii Glover." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 157(January): 204–10. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.021>.
- Ma Zhuo et al. 2017. "Inheritance Mode and Mechanisms of Resistance to Imidacloprid in the House Fly Musca Domestica (Diptera:Muscidae) from China." *PLoS ONE* 12(12): p1–15.
- Madeira Fábio et al. 2019. "The EMBL-EBI Search and Sequence Analysis Tools APIs in 2019." *Nucleic Acids Research* 47(W1): p636–41.
- Mallet James. 1989. "The Evolution of Insecticide Resistance: Have the Insects Won?" *Trends in Ecology & Evolution* 4(11): 336–40. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169534789900888>.
- Malloy Cole A. et al. 2019. "Pharmacological Identification of Cholinergic Receptor Subtypes: Modulation of Locomotion and Neural Circuit Excitability in Drosophila Larvae." *Neuroscience* 411: p47–64. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.05.016>.
- Mamta B and Rajam M.V. 2017. "RNAi Technology: A New Platform for Crop Pest Control." *Physiology and Molecular Biology of Plants* 23(3): p487–501.
- Mannai Safa, Bitri Lofti and Thany S.H. 2016. "CGMP/CGMP-Dependent Protein Kinase Pathway Modulates Nicotine-Induced Currents through the Activation of α -Bungarotoxin-Insensitive Nicotinic Acetylcholine Receptors from Insect Neurosecretory Cells." *Journal of Neurochemistry*: p931–38.
- Markussen Mette DK and Kristensen Michael. 2010. "Low Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit M α 2 in Neonicotinoid Resistant Strains of Musca Domestica L." *Pest Management Science* 66(11): p1257–62.
- Marshall J et al. 1990. "Sequence and Functional Expression of a Single Alpha Subunit of an Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor." *The EMBO Journal* 9(13): p4391–98.
- Martin Merrill, Czajkowski Cynthia, and Karlin Arthur. 1996. "The Contributions of Aspartyl Residues in the Acetylcholine Receptor γ and δ Subunits to the Binding of Agonists and Competitive Antagonists." *Journal of Biological Chemistry* 271(23): p13497–503.
- Matsuda Kazuhiko et al. 1998. "Effects of the α Subunit on Imidacloprid Sensitivity of Recombinant Nicotinic Acetylcholine Receptors." *British Journal of Pharmacology* 123(3): p518–24.
- Matsuda Kazuhiko et al. 2000. "Role of Loop D of the A7 Nicotinic Acetylcholine Receptor in Its Interaction with the Insecticide Imidacloprid and Related Neonicotinoids." *British Journal of Pharmacology* 130(5): p981–86.

Bibliographie

- Matsuda Kazuhiko, Ihara Makoto, and Sattelle D.B. 2020. "Neonicotinoid Insecticides: Molecular Targets, Resistance, and Toxicity." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 60(1): p241–55.
- Matta Jose A et al. 2017. "NACHO Mediates Nicotinic Acetylcholine Receptor Function throughout the Brain." *Cell Reports* 19(4): p688–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.008>.
- Melander A. L. 1914. "Can Insects Become Resistant to Sprays?1." *Journal of Economic Entomology* 7(2): p167–73.
- Metcalf Robert L. 1989. "Insect Resistance to Insecticides." *Pesticide Science* 26(4): p333–58.
- Middleton Richard E, and Cohen Jonathan B. 1991. "Mapping of the Acetylcholine Binding Site of the Nicotinic Acetylcholine Receptor: [3H]Nicotine as an Agonist Photoaffinity Label." *Biochemistry* 30(28): p6987–97.
- Millar N.S. 2003. "Assembly and Subunit Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Biochemical Society Transactions* 31(4): p869–74.
- Millar N.S. 2008. "RIC-3: A Nicotinic Acetylcholine Receptor Chaperone." *British Journal of Pharmacology* 153(SUPPL. 1): p177–83.
- Millar N.S. 1999. "Heterologous Expression of Mammalian and Insect Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in Cultured Cell Lines." *Biochemical Society Transactions* 27(6): p944–50.
- Millar N.S. 2009. "A Review of Experimental Techniques Used for the Heterologous Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Biochemical Pharmacology* 78(7): p766–76.
- Millar N.S and Denholm Ian. 2007. "Nicotinic Acetylcholine Receptors: Targets for Commercially Important Insecticides." *Invertebrate Neuroscience* 7(1): p53–66.
- Millar N.S and Gotti Cecilia. 2009. "Diversity of Vertebrate Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Neuropharmacology* 56(1): p237–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.041>.
- Millar N.S. 2006. "Ligand-Gated Ion Channels." In *Encyclopedia of Life Sciences*, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, p1–6. <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0000154>.
- Millar N.S and Lansdell S.J. 2010. "Characterisation of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors." In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, Chapter 6, p65–73.
- Minamida Isao et al. 1993. "Synthesis and Insecticidal Activity of Acyclic Nitroethene Compounds Containing a Heteroaryl methylamino Group." *Journal of Pesticide Science* 18(1): p41–48.
- Mineur Yann S, Somenzi Oli and Picciotto Marina R. 2007. "Cytisine, a Partial Agonist of High-Affinity Nicotinic Acetylcholine Receptors, Has Antidepressant-like Properties in Male C57BL/6J Mice." *Neuropharmacology* 52(5): p1256–62.
- Mishina Masayoshi et al. 1985. "Location of Functional Regions of Acetylcholine Receptor α -Subunit by Site-Directed Mutagenesis." *Nature* 313(6001): p364–69.
- Mishina Masayoshi et al. 1986. "Molecular Distinction between Fetal and Adult Forms of Muscle Acetylcholine Receptor." *Nature* 321(6068): p406–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2423878> (May 5, 2020).
- Miyazawa Atsuo, Fujiyoshi Yoshinori, and Unwin Nigel. 2003. "Structure and Gating Mechanism of the Acetylcholine Receptor Pore." *Nature* 423(6943): p949–55.
- Montella Isabela Reis, Schama Renata and Valle Denise. 2012. "The Classification of Esterases: An Important Gene Family Involved in Insecticide Resistance—a Review." *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 107(4): p437–49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666852>.
- Narahashi Toshio. 1996. "Neuronal Ion Channels as the Target Sites of Insecticides." *Pharmacology & Toxicology* 18: p1–14.
- Narahashi Toshio . 2007. "Differential Actions of Insecticides on Target Sites: Basis for Selective Toxicity." *Human and Experimental Toxicology* 26(4): p361–66.
- National Center for Biotechnology Information. 2020. "N-[1-[(6-Chloro-3-Pyridinyl)Methyl]-4,5-Dihydroimidazol-2-Yl]Nitramide | C9H10ClN5O2." *PubChem Database*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86418> (March 1, 2020).
- Nauen R and Elbert A. 1997. "Apparent Tolerance of a Field-Collected Strain of *Myzus Nicotianae* to Imidacloprid Due to Strong Antifeeding Responses." *Pesticide Science* 49(3): p252–58.
- Nauen R et al. 2015. "Flupyradifurone: A Brief Profile of a New Butenolide Insecticide." *Pest Management Science* 71(6): p850–62.
- Newcomer E.J and Dean F.P. 1952. "Orchard Mites Resistant to Parathion in Washington." *Journal of Economic Entomology* 45(6): p1076–78. <http://academic.oup.com/jee/article/45/6/1076/2205379/Orchard-Mites-Resistant-to-Parathion-in-Washington>.
- Noda Masaharu et al. 1983. "Primary Structures of β - And δ -Subunit Precursors of Torpedo Californica Acetylcholine Receptor Deduced from cDNA Sequences." *Nature* 301(5897): p251–55.
- Le Novère Nicolas, Corringer P-J and Changeux J-P. 1999. "Improved Secondary Structure Predictions for a Nicotinic Receptor Subunit: Incorporation of Solvent Accessibility and Experimental Data into a Two-Dimensional Representation." *Biophysical Journal* 76(5): p2329–45.
- Le Novère Nicolas, Corringer P-J and Changeux J-P . 2002. "The Diversity of Subunit Composition in NACHRs: Evolutionary Origins, Physiologic and Pharmacologic Consequences." *Journal of Neurobiology* 53(4): p447–56.

Bibliographie

- Nys Mieke, Kesters Divya and Ulens Chris. 2013. "Structural Insights into Cys-Loop Receptor Function and Ligand Recognition." *Biochemical Pharmacology* 86(8): p1042–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.001>.
- O'Leary M.E and White M.M. 1992. "Mutational Analysis of Ligand-Induced Activation of the Torpedo Acetylcholine Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 267(12): p8360–65.
- Oppold A et al. 2015. "Epigenetic Alterations and Decreasing Insecticide Sensitivity of the Asian Tiger Mosquito *Aedes Albopictus*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122: p45–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.036>.
- Pavliidi Nena, Vontas John and Van Leeuwen Thomas. 2018. "The Role of Glutathione S-Transferases (GSTs) in Insecticide Resistance in Crop Pests and Disease Vectors." *Current Opinion in Insect Science* 27: p97–102. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.007>.
- Picciotto Marina R et al. 1995. "Abnormal Avoidance Learning in Mice Lacking Functional High-Affinity Nicotine Receptor in the Brain." *Nature* 374(6517): p65–67.
- Pickett John and Khambay Bhupinder. 2014. "The History of the Pyrethroid Insecticides." BBSRC: 2p. <https://bbsrc.ukri.org/documents/pyrethroid-timeline-pdf/>.
- Pitman Robert M. 1971. "Transmitter Substances in Insects: A Review." *Comparative and General Pharmacology* 2(7): p347–71.
- Prasittisuk Chusak and Busvine James R. 1977. "DDT - resistant Mosquito Strains with Cross - resistance to Pyrethroids." *Pesticide Science* 8(5): p527–33.
- Prince Richard J and Sine Steven M. 1996. "Molecular Dissection of Subunit Interfaces in the Acetylcholine Receptor. Identification of Residues That Determine Agonist Selectivity." *Journal of Biological Chemistry* 271(42): p25770–77.
- Prole David L and Taylor Colin W. 2019. "Structure and Function of IP 3 Receptors." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11(4): a035063. <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a035063>.
- Puinean Alin M et al. 2010. "Amplification of a Cytochrome P450 Gene Is Associated with Resistance to Neonicotinoid Insecticides in the Aphid *Myzus Persicae*." *PLoS Genetics* 6(6): p1–11.
- Pyakurel Poojan, Shin Mimi and Venton B. Jill. 2018. "Nicotinic Acetylcholine Receptor (NACHR) Mediated Dopamine Release in Larval *Drosophila Melanogaster*." *Neurochemistry International* 114: p33–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.12.012>.
- Ranganathan R, Cannon S.C and Horvitz H.R. 2000. "MOD-1 Is a Serotonin-Gated Chloride Channel That Modulates Locomotory Behaviour in *C. Elegans*." *Nature* 408(November): p470–75. <http://www.wormbase.org/db/misc/paper?name=WBPaper00004415> (May 5, 2020).
- Raymond Valérie et al. 2017. "Influence of Cellular and Molecular Factors on Membrane Target Sensitivity to Insecticides." *Current Medicinal Chemistry* 24(27): p2974–87. <http://www.eurekaselect.com/150918/article>.
- Raymond Valérie and Sattelle D.B. 2002. "Novel Animal-Health Drug Targets from Ligand-Gated Chloride Channels." *Nature Reviews Drug Discovery* 1(6): p427–36. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrd821>.
- Rebers John E and Riddiford Lynn M. 1988. "Structure and Expression of a *Manduca sexta* Larval Cuticle Gene Homologous to *Drosophila* Cuticle Genes." *Journal of Molecular Biology* 203(2): p411–23. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022283688900095>.
- Reenan Robert A. 2001. "The RNA World Meets Behavior: Adenosine-to-Inosine Pre-mRNA Editing in Animals." *Trends in Genetics* 17(2): p53–56.
- Reynolds Jacqueline A, Karlin Arthur and Reynolds Jacqueline A. 1978. "Molecular Weight in Detergent Solution of Acetylcholine Receptor from *Torpedo californica*." *Biochemistry* 17(11): p2035–38.
- Rix Rachel R, Ayyanath Murali M and Cutler G. Christopher. 2016. "Sublethal Concentrations of Imidacloprid Increase Reproduction, Alter Expression of Detoxification Genes, and Prime *Myzus Persicae* for Subsequent Stress." *Journal of Pest Science* 89(2): p581–89.
- Rockstein Morris. 1974. *The Physiology of Insecta*. Second Ed. New York and London: ACADEMIC PRESS, INC.
- Roeder T. 1999. "Octopamine in Invertebrates." *Progress in Neurobiology* 59(5): p533–61.
- Romero Alvaro, and Anderson Troy D. 2016. "High Levels of Resistance in the Common Bed Bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae), to Neonicotinoid Insecticides." *Journal of Medical Entomology* 53(3): p727–31.
- Rust M.K, Reiersen D.A and Hansgen K.H. 1991. "Control of American Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) in Sewers." *Journal of Medical Entomology* 28(2): p210–13.
- Sabourmoghaddam Nasrin, Zakaria Mohamad Pauzi and Omar Dzolkhifli. 2015. "Evidence for the Microbial Degradation of Imidacloprid in Soils of Cameron Highlands." *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 14(2): p182–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2014.03.002>.
- Sakata Kanzo et al. 1978. "Stemospiroline, New Insecticidal Alkaloid of *Stemona japonica* Miq. Isolation, Structural Determination and Activity." *Agricultural and Biological Chemistry* 42(2): p457–63. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00021369.1978.10862996> (September 1, 2020).
- Salgado Vincent L and Saar Raimund. 2004. "Desensitizing and Non-Desensitizing Subtypes of Alpha-Bungarotoxin-Sensitive Nicotinic Acetylcholine Receptors in Cockroach Neurons." *Journal of Insect Physiology* 50(10): p867–79.
- Salgado Vincent L. 2016. "Antagonist Pharmacology of Desensitizing and Non-Desensitizing Nicotinic Acetylcholine Receptors in Cockroach Neurons." *NeuroToxicology* 56: p188–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.08.003>.

Bibliographie

- Sánchez-Bayo Francisco, Goka Koichi and Hayasaka Daisuke. 2016. "Contamination of the Aquatic Environment with Neonicotinoids and Its Implication for Ecosystems." *Frontiers in Environmental Science* 4(NOV): p1–14.
- Sánchez-Bayo Francisco and Wyckhuys Kris A.G. 2019. "Worldwide Decline of the Entomofauna: A Review of Its Drivers." *Biological Conservation* 232(September 2018): p8–27.
- Sargent Peter B. 1993. "The Diversity of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Annual Review of Neuroscience* 16(1): p403–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7681637> (May 5, 2020).
- Sarkar M.A, Roy Sankhajit, Kole R.K and Chowdhury Ashim. 2001. "Persistence and Metabolism of Imidacloprid in Different Soils of West Bengal." *Pest Management Science* 57(7): p598–602.
- Sattelle D.B. 1980. "Acetylcholine Receptors of Insects." *Advances in Insect Physiology* 15(C): p215–315.
- Sattelle D.B. 2009. "Invertebrate Nicotinic Acetylcholine Receptors-Targets for Chemicals and Drugs Important in Agriculture, Veterinary Medicine and Human Health." *Journal of Pesticide Science* 34(4): p233–40.
- Sawruk E, Schloss P, Betz H and Schmitt B. 1990. "Heterogeneity of Drosophila Nicotinic Acetylcholine Receptors: SAD, a Novel Developmentally Regulated Alpha-Subunit." *The EMBO Journal* 9(9): p2671–77.
- Sawruk E, Udri C, Betz H and Schmitt B. 1990. "SBD, a Novel Structural Subunit of the Drosophila Nicotinic Acetylcholine Receptor, Shares Its Genomic Localization with Two α -Subunits." *FEBS Letters* 273(1–2): p177–81.
- Schloss Patrick, Betz Heinrich, Schroder Christiane and Gundelfinger Eckart D. 1991. "Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in Drosophila: Antibodies Against an α -Like and a Non- α -Subunit Recognize the Same High-Affinity α -Bungarotoxin Binding Complex." *Journal of Neurochemistry* 57(5): p1556–62. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.1991.tb06351.x>.
- Schmidt-Nielsen B.K, Gepner J.I, Teng N.N.H and Hall L.M. 1977. "Characterization of an α -Bungarotoxin Binding Component from Drosophila Melanogaster." *Journal of neurochemistry* 29: p1013–29.
- Schmuck Richard, Schning Ralf, Stork Andreas and Schramel Oliver. 2001. "Risk Posed to Honeybees (*Apis Mellifera* L, Hymenoptera) by an Imidacloprid Seed Dressing of Sunflowers." *Pest Management Science* 57(3): p225–38.
- Scholz Konrad and Reinhard Fritz. 1999. "Photolysis of Imidacloprid (NTN 33893) on the Leaf Surface of Tomato Plants." *Pesticide Science* 55(6): p652–54.
- Schroeder M.E and Flattum R.F. 1984. "The Mode of Action and Neurotoxic Properties of the Nitromethylene Heterocycle Insecticides." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 22(2): p148–60.
- Schulz Regine et al. 2000. "Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors from Drosophila: Two Different Types of α Subunits Coassemble within the Same Receptor Complex." *Journal of Neurochemistry* 74(6): p2537–46. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.2000.0742537.x> (May 6, 2020).
- Scott Jeffrey G and Wen Zhimou. 1997. "Toxicity of Fipronil to Susceptible and Resistant Strains of German Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) and House Flies (Diptera: Muscidae)." *Journal of Economic Entomology* 90(5): p1152–56. <http://academic.oup.com/jee/article/90/5/1152/2216716/Toxicity-of-Fipronil-to-Susceptible-and-Resistant>.
- Seeburg Peter H. 2002. "A-to-I Editing: New and Old Sites, Functions and Speculations." *Neuron* 35(1): p17–20. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627302007602>.
- Selvam Balaji et al. 2015. "Imidacloprid and Thiocloprid Neonicotinoids Bind More Favourably to Cockroach than to Honeybee α 6 Nicotinic Acetylcholine Receptor: Insights from Computational Studies." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 55: p1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmgm.2014.10.018>.
- Seraydar K.R and Kaufman P.E. 2015. "Does Behaviour Play a Role in House Fly Resistance to Imidacloprid-Containing Baits?" *Medical and Veterinary Entomology* 29(1): p60–67.
- Sgard F et al. 1998. "Cloning and Functional Characterisation of Two Novel Nicotinic Acetylcholine Receptor α Subunits from the Insect Pest Myzus Persicae." *Journal of Neurochemistry* 71(3): p903–12.
- Shan Tisheng et al. 2020. "Low Expression Levels of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits α 6 and β 1 Are Associated with Imidacloprid Resistance in *Bradysia Odoriphaga*." *Pest Management Science* 76(9): 3038–45.
- Shan Yuan et al. 2020. "Effect of Imidacloprid on the Behavior, Antioxidant System, Multixenobiotic Resistance, and Histopathology of Asian Freshwater Clams (*Corbicula Fluminea*)." *Aquatic Toxicology* 218: 105333. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105333>.
- Shao Ya-Ming, Dong Ke and Zhang Chuan-Xi. 2007. "The Nicotinic Acetylcholine Receptor Gene Family of the Silkworm, *Bombyx Mori*." *BMC Genomics* 8: 324. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868469> (May 6, 2020).
- Shi Mi et al. 2014. "Identification of Redeye, a New Sleepregulating Protein Whose Expression Is Modulated by Sleep Amount." *eLife* 2014(3): p1–17.
- Shi Teng Fei et al. 2017. "Sublethal Effects of the Neonicotinoid Insecticide Thiamethoxam on the Transcriptome of the Honey Bees (Hymenoptera: Apidae)." *Journal of Economic Entomology* 110(6): p2283–89.
- Shimomura M et al. 2006. "Role in the Selectivity of Neonicotinoids of Insect-Specific Basic Residues in Loop D of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist Binding Site." *Molecular Pharmacology* 70(4): p1255–63. <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.106.026815>.

Bibliographie

- Shimomura M et al. 2002. "Effects of Mutations of a Glutamine Residue in Loop D of the A7 Nicotinic Acetylcholine Receptor on Agonist Profiles for Neonicotinoid Insecticides and Related Ligands." *British Journal of Pharmacology* 137(2): p162–69.
- Shimomura M et al. 2004. "Roles of Loop C and the Loop B-C Interval of the Nicotinic Receptor α Subunit in Its Selective Interactions with Imidacloprid in Insects." *Neuroscience Letters* 363(3): p195–98.
- Shimomura M et al. 2005. "Insect-Vertebrate Chimeric Nicotinic Acetylcholine Receptors Identify a Region, Loop B to the N-Terminus of the Drosophila D α 2 Subunit, Which Contributes to Neonicotinoid Sensitivity." *Neuroscience Letters* 385(2): p168–72.
- Simão Felipe A et al. 2015. "BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness with Single-Copy Orthologs." *Bioinformatics* 31(19): p3210–12. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btv351>.
- Simon-Delso N et al. 2015. "Systemic Insecticides (Neonicotinoids and Fipronil): Trends, Uses, Mode of Action and Metabolites." *Environmental Science and Pollution Research* 22(1): p5–34.
- Sinakevitch I.G, Geffard M, Pelhate M, and Lapied B. 1995. "Octopaminergic Dorsal Unpaired Median (DUM) Neurons Innervating the Colleterial Glands of the Female Cockroach *Periplaneta Americana*." *Journal of Experimental Biology* 198(7): p1539–44.
- Sinakevitch I.G, Geffard M, Pelhate M, and Lapied B. 1996. "Anatomy and Targets of Dorsal Unpaired Median Neurons in the Terminal Abdominal Ganglion of the Male Cockroach *Periplaneta Americana* L." *Journal of Comparative Neurology* 367(1): p147–63.
- Sine Steven M. 2002. "The Nicotinic Receptor Ligand Binding Domain." *Journal of Neurobiology* 53(4): p431–46.
- Skok Maryna V. 2009. "Editorial: To Channel or Not to Channel? Functioning of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Leukocytes." *Journal of Leukocyte Biology* 86(1): p1–3.
- Smith A.G. 1961. "Presence of Insecticide Resistant Apple Leaf Rollers in Nelson." *Orchadist* 34: p315–17.
- Smith Hugh A, Nagle Curtis A, MacVean Charles A and McKenzie Cindy L. 2016. "Susceptibility of Bemisia Tabaci MEAM1 (Hemiptera: Aleyrodidae) to Imidacloprid, Thiamethoxam, Dinotefuran and Flupyradifurone in South Florida." *Insects* 7(4): p1–12.
- Smith McHardy M et al. 2000. "Nodulisporic Acid Opens Insect Glutamate-Gated Chloride Channels: Identification of a New High Affinity Modulator." *Biochemistry* 39(18): p5443–54.
- Sogorb Miguel A and Vilanova Eugenio. 2002. "Enzymes Involved in the Detoxification of Organophosphorus, Carbamate and Pyrethroid Insecticides through Hydrolysis." 128: p215–28.
- Soloway S.B et al. 1978. "Nitromethylene Heterocycles as Insecticides." *Pesticide and Venom Neurotoxicity*: p153–58.
- Soloway S.B, Henry A.C, Kollmeyer W.D and Padgwt W.M. 1979. Nitromethylene Insecticides. In ' "Advances in Pesticide Science" Part II, Eds. Geissbühler, H., Brooks, GT, and Kearney, PC. Geissbühle. ed. Pergamon. Oxford.
- Somers Jason et al. 2017. "Pleiotropic Effects of Loss of the D α 1 Subunit in *Drosophila Melanogaster*: Implications for Insecticide Resistance." *Genetics* 205(1): p263–71.
- Sparks Thomas C et al. 2013. "Sulfoxaflor and the Sulfoximine Insecticides: Chemistry, Mode of Action and Basis for Efficacy on Resistant Insects." *Pesticide Biochemistry and Physiology*. <http://www.mendeley.com/research/sulfoxaflor-sulfoximine-insecticides-chemistry-mode-action-basis-efficacy-resistant-insects>.
- Sparks Thomas C and Nauen Ralf. 2015. "IRAC: Mode of Action Classification and Insecticide Resistance Management." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 121: 122–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>.
- Stankiewicz Maria, Dbrowski Marcin and De Lima Maria Elena. 2012. "Nervous System of *Periplaneta Americana* Cockroach as a Model in Toxicological Studies: A Short Historical and Actual View." *Journal of Toxicology* 2012: 12p.
- Strobel Anneli et al. 2016. "Persistent Organic Pollutants in Tissues of the White-Blooded Antarctic Fish *Champscephalus Gunnari* and *Chaenocephalus Aceratus*." *Chemosphere* 161: p555–62. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653516301047> (June 4, 2020).
- Strobel Anneli et al. 2018. "Persistent Organic Pollutants in Red- and White-Blooded High-Antarctic Nototheniid Fish from the Remote Weddell Sea." *Chemosphere* 193: p213–22. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517317873> (June 4, 2020).
- Su Hailing and O'Dowd Diane K. 2003. "Fast Synaptic Currents in *Drosophila* Mushroom Body Kenyon Cells Are Mediated by Alpha-Bungarotoxin-Sensitive Nicotinic Acetylcholine Receptors and Picrotoxin-Sensitive GABA Receptors." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(27): p9246–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14534259>.
- Suchail S, Guez D and Belzunces L.P. 2001. "Discrepancy between Acute and Chronic Toxicity Induced by Imidacloprid and Its Metabolites in *Apis Mellifera*." *Environmental toxicology and chemistry* 20(11): p2482–86.
- Sumikawa K et al. 1982. "The Molecular Cloning and Characterisation of cDNA Coding for the α Subunit of the Acetyl-Choline Receptor." *Nucleic Acids Research* 10(19): p5809–22.
- Sun Huahua et al. 2017. "The Potential Subunits Involved in Two Subtypes of α -Bgt-Resistant NACHRs in Cockroach Dorsal Unpaired Median (DUM) Neurons." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 81: p32–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.11.009>.
- Taillebois Emiliane. 2014. "Caractérisation Moléculaire et Pharmacologique Des Récepteurs Cholinergiques de Type Nicotinique (NACHRs) Chez Les Insectes (Thèse de Doctorat de l'Université d'Angers)."

Bibliographie

- Taillebois Emiliane et al. 2014. "Neonicotinoid Binding, Toxicity and Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon Pisum*." PLoS ONE 9(5) : e96669. doi:10.1371/journal.pone.0096669.
- Taillebois Emiliane, Cartereau Alison, Jones Andrew K and Thany Steeve H. 2018. "Neonicotinoid Insecticides Mode of Action on Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors Using Binding Studies." Pesticide Biochemistry and Physiology 151(April): p59–66. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.007>.
- Takahashi H. et al. 1992. "NI-25, a New Type of Systemic and Broad Spectrum Insecticide." Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases: p89–96.
- Tamura S, Sakata K and Sakurai A. 1978. "Stemofoline as Insecticide." JP 53127825 A (Institute of Physical and Chemical Research, Japan).
- Tasman Kiah et al. 2020. "Neonicotinoids Disrupt Memory, Circadian Behaviour and Sleep." bioRxiv Pharmacology and Toxicology: p1–27. http://biorxiv.org/cgi/content/short/2020.04.07.030171v1?rss=1&utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RE_SR_MRKT_Researcher_inbound.
- Thacker J.R.M. 2002. An Introduction to Arthropod Pest Control. Cambridge: Cambridge University Press. <http://www.cambridge.org>, 343p.
- Thany S.H et al. 2007. "Exploring the Pharmacological Properties of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors." Trends in Pharmacological Sciences 28(1): p14–22. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165614706002719>.
- Thany S.H and Tricoire-Leignel Helene. 2011. "Emerging Pharmacological Properties of Cholinergic Synaptic Transmission: Comparison between Mammalian and Insect Synaptic and Extrasynaptic Nicotinic Receptors." Current Neuropharmacology 999(999): p1–9.
- Thany S.H and Tricoire-Leignel Helene. 2009. "Agonist Actions of Clothianidin on Synaptic and Extrasynaptic Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed on Cockroach Sixth Abdominal Ganglion." NeuroToxicology 30(6): p1045–52.
- Thany S.H, Courjaret Raphael, and Lapied Bruno. 2008. "Effect of Calcium on Nicotine-Induced Current Expressed by an Atypical α -Bungarotoxin-Insensitive NACHR2." Neuroscience Letters 438(3): p317–21.
- Tiwari Balkrishna, Kharwar Surbhi, and Tiwari D.N. 2018. "Pesticides and Rice Agriculture." In Cyanobacteria: From Basic Science to Applications, Elsevier Inc., p303–25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00015-5>.
- Tomizawa Motohiro and Casida John E. 2003. "Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors." Annual review of entomology 48(1): p339–64. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ento.48.091801.112731>.
- Tomizawa Motohiro and Casida John E. 2005. "Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action." Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45(1): p247–68.
- Tomizawa Motohiro, Millar N.S and Casida John E. 2005. "Pharmacological Profiles of Recombinant and Native Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors." Insect Biochemistry and Molecular Biology 35(12): p1347–55.
- Tomizawa Motohiro, and Yamamoto Izuru. 1993. "Structure-Activity Relationships of Nicotinoids and Imidacloprid Analogs." Journal of Pesticide Science 18(1): p91–98.
- Tovar Kenneth R and Westbrook Gary L. 2012. "Ligand-Gated Ion Channels." In Cell Physiology Source Book, Elsevier, p549–62. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387738-3.00031-7>.
- Trimmer Barry Andrew and Weeks Janis. 1989. "Effects of Nicotinic and Muscarinic Agents on an Identified Motoneurone and Its Direct Afferent Inputs in Larval *Manduca sexta*." Journal of Experimental Biology 144(1): p303–37.
- Ujváry István. 1999. "Nicotine and Other Insecticidal Alkaloids." Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor (Pelletier 1983): p29–69.
- Unwin Nigel. 2005. "Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4 Å Resolution." Journal of Molecular Biology 346(4): p967–89.
- Usherwood P.N.R. 1994. "Insect Glutamate Receptors." Advances in Insect Physiology 24: p309–41.
- Usui Hirofumi et al. 1998. "Activation of Protein Phosphatase 2A by CAMP-Dependent Protein Kinase-Catalyzed Phosphorylation of the 74-KDa B^δ Regulatory Subunit in Vitro and Identification of the Phosphorylation Sites." FEBS Letters 430(3): p312–16. [http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793\(98\)2900684-X](http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793(98)2900684-X) (May 14, 2020).
- Vollset Stein Emil et al. 2020. "Fertility, Mortality, Migration, and Population Scenarios for 195 Countries and Territories from 2017 to 2100: A Forecasting Analysis for the Global Burden of Disease Study." The Lancet: p1–22. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30677-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30677-2).
- Wada-Katsumata Ayako, Silverman Jules and Schal Coby. 2013. "Changes in Taste Neurons Support the Emergence of an Adaptive Behavior in Cockroaches." Science 340(6135): p972–75.
- Wang Changlu, Scharf Michael E and Bennett Gary W. 2004. "Behavioral and Physiological Resistance of the German Cockroach to Gel Baits (Blattodea: Blattellidae)." Journal of Economic Entomology 97(6): p2067–72.
- Wang K.Y et al. 2002. "Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) to Fenvalerate and Imidacloprid and Activities of Detoxification Enzymes on Cotton and Cucumber." Journal of economic entomology 95(2): p407–13.
- Wang Kang et al. 2018. "Characterisation of Imidacloprid Resistance in the Bird Cherry-Oat Aphid, *Rhopalosiphum padi*, a Serious Pest on Wheat Crops." Pest Management Science 74(6): p1457–65.

Bibliographie

- Wang Xin, Meng Xiangkun et al. 2015. "Cys-Loop Ligand-Gated Ion Channel Gene Discovery in the *Locusta migratoria manilensis* through the Neuron Transcriptome." *Gene* 561(2): p276–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.02.048>.
- Wang Xin, Sun Huahua et al. 2015. "Transcriptional Changes in NACHRs, Interactive Proteins and P450s in *Locusta migratoria manilensis* (Orthoptera: Acrididae) CNS in Response to High and Low Oral Doses of Imidacloprid." *Journal of Insect Science* 15(1).
- Watson A.H.D. 1984. "The Dorsal Unpaired Median Neurons of the Locust Metathoracic Ganglion: Neuronal Structure and Diversity, and Synapse Distribution." *Journal of Neurocytology* 13(2): p303–27.
- Watson Gerald B et al. 2017. "Characterization of a Nicotinic Acetylcholine Receptor Binding Site for Sulfoxaflor, a New Sulfoximine Insecticide for the Control of Sap-Feeding Insect Pests." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 143(August): p90–94. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.09.003>.
- Watson J.D and Crick F.H.C. 1953. "Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid." *Nature* 171(4356): p737–38.
- Webb Patrick et al. 2018. "Hunger and Malnutrition in the 21st Century." *BMJ (Online)* 361.
- Wiesmann V.R. 1947. "Untersuchungen Über Das Physiologische Verhalten von *Musca domestica* L. Verschiedener Provenienzen." *Mitt Schweiz Entomol Ges.* 20: p484–504.
- Wilkins, M.H.F, Gosling R.G and Seeds W.E. 1951. "Physical Studies of Nucleic Acid: Nucleic Acid: An Extensible Molecule?" *Nature* 167(4254): p759–60.
- Windley Monique J, Vetter Irina, Lewis Richard J and Nicholson Graham M. 2017. "Lethal Effects of an Insecticidal Spider Venom Peptide Involve Positive Allosteric Modulation of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors." *Neuropharmacology* 127: p224–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.008>.
- Wu Meilin, Robinson James E and Joiner William J. 2014. "SLEEPLESS Is a Bifunctional Regulator of Excitability and Cholinergic Synaptic Transmission." *Current Biology* 24(6): p621–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.02.026>.
- Wu Ming-Cheng, Chang Yu-Wen, Lu Kuang-Hui and Yang En-Cheng. 2017. "Gene Expression Changes in Honey Bees Induced by Sublethal Imidacloprid Exposure during the Larval Stage." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 88: p12–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.06.016>.
- Wüstenberg Daniel G and Grünewald Bernd. 2004. "Pharmacology of the Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor of Cultured Kenyon Cells of the Honeybee, *Apis mellifera*." *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 190(10): p807–21.
- Xu Lu et al. 2016. "Lethal and Sublethal Effects of Sulfoxaflor on the Small Brown Planthopper *Laodelphax striatellus*." *Journal of Asia-Pacific Entomology* 19(3): p683–89.
- Yamamoto Izuru and Kamimura Hideo. 1963. "Studies on Nicotinoids as Insecticides, Part II. Nicotine Isomers." *Agr. Biol. Chem.* 27(6).
- Yang Xin et al. 2016. "Glutathione S-Transferases Are Involved in Thiamethoxam Resistance in the Field Whitefly *Bemisia tabaci* Q (Hemiptera: Aleyrodidae)." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 134: p73–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.04.003>.
- Yao Xiangmei et al. 2008. "Amino Acids within Loops D, E and F of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor β Subunits Influence Neonicotinoid Selectivity." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(9): p834–40.
- Yao Xiangmei et al. 2009. "Nicotinic Acetylcholine Receptor B1 Subunit from the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*: A-to-I RNA Editing and Its Possible Roles in Neonicotinoid Sensitivity." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(5–6): p348–54.
- Ye Chao et al. 2019. "Induction of RNAi Core Machinery's Gene Expression by Exogenous DsRNA and the Effects of Pre-Exposure to DsRNA on the Gene Silencing Efficiency in the Pea Aphid (*Acyrtosiphon pisum*)." 9(January): p1–10.
- Zalucki M.P and Furlong M.J. 2017. "Behavior as a Mechanism of Insecticide Resistance: Evaluation of the Evidence." *Current Opinion in Insect Science* 21: p19–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.006>.
- Zewen Liu et al. 2003. "Selection for Imidacloprid Resistance in *Nilaparvata lugens*: Cross-Resistance Patterns and Possible Mechanisms." *Pest Management Science* 59(12): p1355–59.
- Zhang Huiming, Lang Zhaobo and Zhu Jian-Kang. 2018. "Dynamics and Function of DNA Methylation in Plants." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*: 1. <http://www.nature.com/articles/s41580-018-0016-z>.
- Zhang J, Goyer C and Pelletier Y. 2008. "Environmental Stresses Induce the Expression of Putative Glycine-Rich Insect Cuticular Protein Genes in Adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say)." *Insect Molecular Biology* 17(3): p209–16.
- Zhang Yixi et al. 2009. "Functional Co-Expression of Two Insect Nicotinic Receptor Subunits (N1 α 3 and N1 α 8) Reveals the Effects of a Resistance-Associated Mutation (N1 α 3 Y151S) on Neonicotinoid Insecticides." *Journal of Neurochemistry* 110(6): p1855–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19627438>.
- Zhang Yixi et al. 2015. "Reduction in mRNA and Protein Expression of a Nicotinic Acetylcholine Receptor A8 Subunit Is Associated with Resistance to Imidacloprid in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*." *Journal of Neurochemistry* 135(4): p686–94.
- Zhang Yixi, Yang Yuanxue, Sun Huahua and Zewen Liu. 2016. "Metabolic Imidacloprid Resistance in the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*, Relies on Multiple P450 Enzymes." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 79.
- Zhang Zong Hong et al. 2014. "A Comparative Study of Techniques for Differential Expression Analysis on RNA-Seq Data." *PLoS ONE* 9(8).

Bibliographie

- Zhao Yunhe et al. 2018. "Sublethal Effects of Chlorfenapyr on the Life Table Parameters, Nutritional Physiology and Enzymatic Properties of *Bradysia Odoriphaga* (Diptera: Sciaridae)." *Pesticide Biochemistry and Physiology* 148(March): p93–102. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.003>.
- Zheng Yingcong et al. 2002. "Identification of Two Novel *Drosophila Melanogaster* Histamine-Gated Chloride Channel Subunits Expressed in the Eye." *Journal of Biological Chemistry* 277(3): p2000–2005.
- Zhu Yuanming et al. 2011. "Discovery and Characterization of Sulfoxaflor, a Novel Insecticide Targeting Sap-Feeding Pests." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(7): p2950–57. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf102765x>.
- Zimniak Piotr et al. 2003. "Of the Epsilon Class." *Society* 669: p661–69.

Table des illustrations

Figure 1. Familles de récepteurs appartenant à la famille des LGIC.....	20
Figure 2. Sous-unités des récepteurs « Cys-loop ».....	22
Figure 3. Structures d'un récepteur nicotinique	24
Figure 4. Représentation schématique d'un récepteur nicotinique et le site de fixation	25
Figure 5. Réaction de désamination catalysée par l'adénosine désaminase (ADAR)	31
Figure 6. Conformation adoptée par le récepteur nicotinique	45
Figure 7. Courants cholinergiques de neurones exprimant des nAChD et nAChN.....	46
Figure 8. Etat de désensibilisation du nAChD	46
Figure 9. Voies de signalisation régulant l'activité des récepteurs nicotiniques	49
Figure 10. Potentielles voies de signalisation impliquées dans la régulation de nAChR1	51
Figure 11. Potentielles voies de signalisation impliquées dans la régulation de nAChR2	53
Figure 12. Synapse cholinergique entre deux neurones	54
Figure 13. Évolution de l'utilisation des insecticides au cours du temps.....	59
Figure 14. Évolution du nombre d'espèces d'insectes résistantes aux insecticides.....	60
Figure 15. Molécule de Flupyradifurone	61
Figure 16. Molécule de Triflumézopyrime	62
Figure 17. Molécule de Sulfoxaflure	63
Figure 18. Exemples de molécules appartenant à la famille des néonicotinoïdes.....	65
Figure 19. Molécule d'Imidaclopride	66
Figure 20. Molécules appartenant à la famille des néonicotinoïdes	67
Figure 21. Molécule d'acétylcholine et potentiel électrostatique	68
Figure 22. Evolution des parts de marché des produits phytosanitaires	68
Figure 23. Enzymes de détoxification : Phases I et II	77
Figure 24. Voie de détoxification possible de l'Imidaclopride	78
Figure 25. Phénomène d'hormèse appliqué aux insecticides	82
Figure 26. Phylogénie de la blatte américaine <i>Periplaneta americana</i>	86

Table des illustrations

Figure 27. Stade de développement de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	87
Figure 28. Système nerveux de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	89
Figure 29. Protocole d'intoxication	92
Figure 30. Mode d'action des dsRNAs et des siRNA.....	99
Figure 31. Schéma du séquençage ARN.....	104
Figure 32. Synthèse des outils bioinformatiques utilisés.....	106
Figure 33. Expressions relatives des ARNm codants pour la sous-unité nicotinique $\beta 1$	198
Figure 34. Mortalité à la DL_{50} de blatte ayant ingéré de dsRNA ciblant $\beta 1$	199
Figure 35. Expression quantitative relative des ARNm codant pour les sous-unités nicotiniques	202
Figure 36. Heatmap des profils d'expression des gènes d'intérêt.....	203
Figure 37. Expression quantitative relative des ARNm codant pour les protéines auxiliaires	204
Figure 38. Expression quantitative relative des ARNm codant pour les voies de signalisation.....	204
Figure 39. Expression quantitative relative des ARNm codant pour les protéines synaptiques	205
Figure 40. Diagrammes de Venn des gènes différentiellement exprimés entre 30 et 60 jours	206
Figure 41. Diagramme de Venn des gènes différentiellement exprimés entre D30 et I30 en fonction des méthodes d'analyse Deseq2 ou edgeR.	207
Figure 42. Diagramme de Venn des gènes différentiellement exprimés entre D60 et I60 en fonction des méthodes d'analyse Deseq2 ou edgeR.	208

Table des tableaux

Tableau 1. Tableau recensant les sous-unités nicotiniques chez différentes espèces d'insectes	28
Tableau 2. Tableau non exhaustif des profils pharmacologiques des récepteurs nicotiniques natifs.	33
Tableau 3. Tableau non exhaustif de combinaisons de sous-unités nicotiniques de <i>Drosophila melanogaster</i> et de la pharmacologie associée	39
Tableau 4. Tableau non exhaustif de combinaisons de sous-unités nicotiniques de <i>Drosophila melanogaster</i> et des réponses associées	40
Tableau 5. Tableau non exhaustif de combinaisons de sous-unités nicotiniques de <i>Myzus persicae</i> et de la pharmacologie associée	41
Tableau 6. Tableau résumant les résultats obtenus par les études d'expression en système hétérologue de sous-unités nicotiniques formant des récepteurs nicotiniques recombinés, pour <i>N. lugens</i>	43
Tableau 7. Tableau résumant les résultats obtenus lors de l'expression en système hétérologue de récepteurs nicotiniques de <i>Periplaneta americana</i>	43
Tableau 8. Tableau rapportant les toxicités sous forme de dose ou de concentration létales à 50% en fonction des espèces et des voies d'administration de l'Imidaclopride	71
Tableau 9. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des cadres ouverts de lecture des sous-unités nicotiniques identifiées chez la blatte <i>Periplaneta americana</i>	94
Tableau 10. Tableau récapitulatif des amorces utilisées en qPCR pour quantifier les niveaux d'expression des transcrits codants pour les sous-unités décrites chez la blatte américaine <i>Periplaneta americana</i>	98
Tableau 11. Séquences des amorces utilisées pour la synthèse des dsRNAs	100
Tableau 12. Séquences index correspondant à chaque condition et réplicat.....	103

Titre : Une exposition subchronique à une dose sublétales d'Imidaclopride peut-elle entraîner une modification des récepteurs nicotiques chez la blatte *Periplaneta americana* ?

Mots clés : Insecte ; Blatte ; Récepteurs nicotiques ; Imidaclopride ; Dose sublétales ; Accommodation

Résumé : Bien que l'utilisation des insecticides contre les insectes ravageurs de culture ait permis d'accomplir des progrès en matière de rendements agricoles, leur utilisation a également entraîné l'apparition d'insectes résistants. Alors que les mécanismes de résistance sont bien connus, peu de données sont disponibles sur l'effet d'une exposition des insectes à une dose sublétales d'insecticide. L'objectif de cette étude est donc de caractériser les modifications cellulaires et moléculaires développées chez la blatte *P. americana* exposée à une dose sublétales d'un insecticide : l'Imidaclopride. Nous avons montré qu'après une exposition pendant 30 jours à une dose sublétales d'Imidaclopride, les blattes devenaient moins sensibles à cet insecticide et que cette modification de la sensibilité des blattes était maintenue 30 jours après l'arrêt du traitement à l'Imidaclopride. Grâce à des analyses biochimiques et moléculaires, nous avons démontré que les principaux acteurs dans ce phénomène sont les récepteurs nicotiques (nAChRs) qui sont les cibles moléculaires de l'Imidaclopride.

De plus, dans le but de développer de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes nuisibles, nous avons rendu de nouveau sensibles à l'Imidaclopride les blattes accommodées aux traitements en ciblant les nAChRs par l'interférence ARN. Étant donné que ces récepteurs jouent un rôle primordial dans l'accommodation des blattes à l'Imidaclopride et que l'expression et l'activité de ces récepteurs peuvent être régulées par de nombreuses protéines, nous avons entrepris un séquençage à haut-débit du transcriptome (RNA-seq) issu du dernier ganglion abdominal de la blatte afin de déterminer l'ensemble des gènes différentiellement exprimés après traitement des blattes à l'Imidaclopride ainsi que 30 jours après l'arrêt de ce traitement. L'ensemble de ces travaux de thèse contribue au développement de nos connaissances sur les effets des doses sublétales sur les insectes et sur les mécanismes d'accommodation afin de pouvoir les prendre en considération dans les stratégies de lutte contre les insectes nuisibles.

Title: Could a subchronic exposure to a sublethal dose of imidacloprid modify acetylcholine nicotinic receptors in cockroach *Periplaneta americana*?

Keywords: Insect, cockroach, acetylcholine nicotinic receptor, imidacloprid, sublethal exposure, acclimation

Abstract: Although the use of insecticides against pests has allowed to achieve huge progress in agriculture yields, their widespread use has also led to resistance emergence resulting in a decrease in the insecticide efficiency. While resistance mechanisms are well-known, few studies are available on the effect of insect exposure to a sublethal dose of insecticide. The aim of this study is therefore to characterize the cellular and molecular changes induced by an exposure of the cockroaches *P. americana* to a sublethal dose of imidacloprid which belongs to the neonicotinoid insecticide class. We first showed that cockroaches exposed to a sublethal dose of imidacloprid during 30 days became less sensitive to this insecticide and this loss of sensitivity was maintained overtime. Using biochemical and molecular analysis, we demonstrated that the main actors in this phenomenon are the acetylcholine

nicotinic receptors (nAChRs). In order to develop new strategies against pests, we reversed the loss of sensitivity observed in acclimated cockroaches using interference RNA targeting nAChR subunit. Finally, since nAChRs play an essential role in the acclimation of the cockroaches to imidacloprid and the nAChR activity is regulated by many proteins, we realized high throughput sequencing of transcriptome (RNAseq) from the last abdominal ganglion of the cockroach in order to determine all genes differentially expressed after imidacloprid treatment and 30 days later. This PhD work contributes to the development of our knowledge on the effects of sublethal doses of insecticides on insects but also on adaptation mechanisms. These last points could be taken into account in order to improve pest management.