



HAL
open science

Utilisation de la technique d'interférence ARN dirigée contre les acteurs du système cholinergique pour lutter contre les insectes ravageurs

Sébastien Ligonnière

► **To cite this version:**

Sébastien Ligonnière. Utilisation de la technique d'interférence ARN dirigée contre les acteurs du système cholinergique pour lutter contre les insectes ravageurs. Sciences agricoles. Université d'Angers, 2023. Français. NNT : 2023ANGE0059 . tel-04861132

HAL Id: tel-04861132

<https://theses.hal.science/tel-04861132v1>

Submitted on 2 Jan 2025

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

SOUS LE SCEAU DE
LA COMUE ANGERS – LE MANS

ECOLE DOCTORALE N° 642

Ecole doctorale Végétal, Animal, Aliment, Mer, Environnement

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

Par

Sébastien LIGONNIERE

Utilisation de la technique d'interférence ARN dirigée contre les acteurs du système cholinergique pour lutter contre les insectes ravageurs

Thèse présentée et soutenue à l'Université d'Angers, le 19 décembre 2023

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

Rapporteurs avant soutenance :

Mme Federica CALEVRO

Directrice de Recherche, INRAE, Lyon

M. Cédric ALAUX

Directeur de Recherche, INRAE, Avignon

Composition du Jury :

Examineurs : Mme Emmanuelle JOLY

Directrice de Recherche, INRAE, Paris

M. Luc BELZUNCES

Directeur de Recherche, INRAE, Avignon

M. Matthieu ROUSSET

Chargé de Recherche, INSERM, Montpellier

Dir. de thèse : Mme Valérie RAYMOND

Professeure des Universités, Université d'Angers

Co-encadrante : Mme Delphine GOVEN

Maîtresse de Conférences, Université d'Angers

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



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

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

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



Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury. Je remercie Federica Calevro et Cédric Allaux pour la révision de ce manuscrit ainsi que Emmanuelle Joly, Luc Belzunces et Matthieu Rousset pour avoir accepté de venir discuter de mon travail.

Je tiens particulièrement à remercier mes encadrantes de thèse, Valérie Raymond et Delphine Goven, sans qui ce travail n'aurait pas existé. Merci de m'avoir accompagné du master au doctorat bien que l'une des premières choses que je vous ai dites est que je ne pensais pas être capable de réaliser une thèse. Votre bienveillance et votre confiance envers moi ont été des moteurs dans la réalisation de ce travail. Et surtout, merci d'avoir toujours valorisé mes efforts et mon travail même quand je perdais confiance en moi.

Je remercie Véronique Jean et Josy Froger avec qui j'ai beaucoup aimé travailler et qui m'ont poussé à m'affirmer au laboratoire. Je remercie également Xavier Leray, Corinne Lefrançois, Véronique Apaire-Marchais, Emmanuelle Baudouin et Catherine Pawlonski pour leur accueil et leur gentillesse.

Je tiens également à remercier les doctorants du laboratoire SiFCIR. Même s'ils m'ont fait flipper sur le doctorat dès le premier jour, je remercie Stéphane, Alexandre et Alexandre qui ont vécu les galères de la thèse avant moi. J'ai sûrement évité pas mal de problèmes grâce à vous. Enfin, bon courage à toi Marine pour ta thèse et merci d'avoir rendu mes vendredi après-midi moins long quand on partageait le bureau.

Je tiens à remercier Flavie, Juliette, Léa et Thomas qui sont venus travailler avec moi pendant leur stage. Vous avez été d'une grande aide dans ce travail.

Je remercie mes proches qui ont été d'un grand soutien durant ces trois années. Alexis et Adrien, on a enfin fini la thèse. Même si on a pas mal galéré à certains moments, cela valait le coup. Un grand merci à Armand, Marie et Maëlys pour votre soutien de loin. J'ai hâte de fêter ma thèse avec vous. Je tiens aussi à remercier ma famille. Maman et Sylvie, je vous remercie pour votre soutien pour la thèse mais pas seulement. Grâce à vous, j'ai eu la chance de faire les études que je souhaitais et même si la recherche est un milieu qui vous est inconnu, vous vous êtes toujours intéressés à ce que je faisais. Enfin, Vanessa, je te remercie aussi pour ton soutien. Si tu n'avais pas fait une thèse avant moi, je n'en n'aurais sûrement pas fait une.

Merci.

Table des matières

Liste des abréviations	8
Préambule	12
Introduction	13
Chapitre 1 : Le système cholinergique de l'insecte	13
1. Généralités sur le système cholinergique	13
2. Les récepteurs cholinergiques de type nicotinique	15
2.1. Découverte et généralités sur les récepteurs nicotiniques	15
2.2. Structure tridimensionnelle des récepteurs nicotiniques	16
2.2.1. Structure générale des récepteurs nicotiniques	16
2.2.2. Structure des sous-unités nicotiniques	18
2.2.3. Structure des sites de liaison des ligands	19
2.2.4. Structure du pore ionique	21
2.2.5. Dynamique structurale des nAChRs en réponse à la fixation d'un agoniste.....	22
2.3. Diversité des sous-unités nicotiniques d'insectes.....	23
2.3.1. Les sous-unités nicotiniques conservées.....	23
2.3.2. Les sous-unités nicotiniques divergentes.....	25
2.3.3. Les modifications post-transcriptionnelles responsables de la diversification des sous-unités nicotiniques chez les insectes.....	26
a) L'épissage alternatif	26
b) L'édition d'ARN	28
2.4. Pharmacologie générale des récepteurs nicotiniques d'insectes	29
2.4.1. Profils pharmacologiques des récepteurs nicotiniques natifs d'insectes	29
2.4.2. Influence de la composition en sous-unités nicotiniques sur la pharmacologie des récepteurs nicotiniques d'insectes.....	33
2.5. Régulation des récepteurs nicotiniques d'insectes	36
2.5.1. Régulation par des modulateurs allostériques	36
2.5.2. Régulation par des protéines auxiliaires	37
2.5.3. Régulation des récepteurs nicotiniques par les voies de signalisation intracellulaire : exemple des nAChR1 et nAChR2 de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	38
a) Voie de signalisation intracellulaire impliquant les PKC1 et PKC2.....	39
b) Voies de signalisation intracellulaire impliquant la CaMK, la PKA et la PKG	41
2.6. Rôles physiologiques associés aux récepteurs nicotiniques d'insecte	43

2.6.1.	Implication des récepteurs nicotiques dans le comportement de la mouche <i>Drosophila melanogaster</i>	43
2.6.2.	Implication des récepteurs nicotiques dans l'apprentissage et la mémoire de l'abeille <i>Apis mellifera</i>	44
3.	L'acétylcholinestérase	45
3.1.	Découverte et généralités sur l'acétylcholinestérase	45
3.2.	Structure de l'acétylcholinestérase	46
3.2.1.	Structure générale de l'acétylcholinestérase	46
3.2.2.	Structure du site actif de l'acétylcholinestérase et hydrolyse de l'acétylcholine	47
3.3.	Les différentes acétylcholinestérases chez l'insecte	50
3.4.	Rôles physiologiques associés à l'acétylcholinestérase d'insecte.....	52
Chapitre 2 : Les insecticides qui ciblent le système cholinergique, résistance et accommodation		53
1.	Historique et généralités sur les insecticides	53
2.	Les insecticides qui ciblent le système cholinergique	56
2.1.	Les néonicotinoïdes.....	56
2.1.1.	Structure chimique	56
2.1.2.	Diversité des modes d'action des néonicotinoïdes	57
2.1.3.	Interaction néonicotinoïdes-nAChRs d'insecte	59
2.2.	Les insecticides qui ciblent l'acétylcholinestérase	61
2.2.1.	Structure chimique	61
2.2.2.	Mode d'action.....	62
3.	Les phénomènes de résistance aux insecticides	64
3.1.	La résistance métabolique	65
3.2.	Modifications des protéines cibles des insecticides.....	67
4.	Les phénomènes d'accommodation aux insecticides	69
4.1.	Accommodation <i>versus</i> Résistance	69
4.2.	Les doses sublétales d'insecticides.....	69
4.2.1.	Définition et généralités sur les doses sublétales d'insecticides	69
4.2.2.	Modifications transcriptionnelles après une exposition à une dose sublétale d'insecticide.....	71
4.2.3.	Les mécanismes d'accommodation à l'imidaclopride mis en place par la blatte <i>Periplaneta americana</i> après une exposition à une dose sublétale de cet insecticide	72
Chapitre 3 : L'interférence ARN chez l'insecte.....		73
1.	Découverte et généralités sur l'interférence ARN	73
2.	La voie des siRNAs.....	75
2.1.	Absorption cellulaire des dsRNAs exogènes et interférence ARN systémique	75
2.2.	Mécanismes moléculaires responsables de la dégradation de l'ARN cible.....	77
2.2.1.	Clivage des dsRNAs en siRNAs par Dicer	77
2.2.2.	Dégradation de l'ARN cible par Argonaute	79

2.3.	Principaux rôles physiologiques de la voie des siRNAs.....	80
2.3.1.	Implication dans la réponse antivirale de l'insecte	80
2.3.2.	Rôle dans la protection du génome	81
3.	Stratégies favorisant l'efficacité de l'interférence ARN chez l'insecte	81
3.1.	Modes d'application.....	81
3.1.1.	La micro-injection	81
3.1.2.	L'application topique	82
3.1.3.	L'ingestion	82
3.2.	Encapsulation des dsRNAs dans des nanoparticules.....	83
3.2.1.	Les liposomes cationiques	83
3.2.2.	Les polymères	84
3.2.3.	Les virus et particules pseudo-virales	85
3.3.	Importance de la conception des dsRNAs	86
4.	L'interférence ARN dans la lutte contre les insectes	87
4.1.	Les dsRNAs comme agent de biocontrôle	87
4.2.	Utilisation des dsRNAs couplés aux insecticides.....	89
Chapitre 4 : Objectifs de la thèse.....		90
Matériels et méthodes		92
1.	Les modèles d'insectes	92
1.1.	Le puceron du pois <i>Acyrtosiphon pisum</i>	92
1.1.1.	Cycle de vie	92
1.1.2.	Conditions d'élevage	93
1.1.3.	Le système artificiel de nutrition.....	94
1.2.	La blatte <i>Periplaneta americana</i>	96
1.2.1.	Cycle de vie	96
1.2.2.	Conditions d'élevage	98
1.2.3.	Les neurones DUM, modèle cellulaire pour l'étude des effets des molécules à effet insecticide	98
2.	Obtention des dsRNAs qui ciblent le système cholinergique.....	99
2.1.	Conception des dsRNAs d'intérêt	99
2.2.	Production des dsRNAs d'intérêt.....	101
2.2.1.	Production des ADNc nécessaires à l'obtention des dsRNAs d'intérêt	101
	a) Extraction des ARNs totaux d'un puceron adulte	101
	b) Transcription inverse des ARNs totaux du puceron adulte en ADNc	102
2.2.2.	Amplification des fragments spécifiques par PCR.....	102
2.2.3.	Extraction sur gel et purification des amplicons.....	103
2.2.4.	Transcription <i>in vitro</i>	103
2.2.5.	Purification des dsRNAs d'intérêt	104
3.	Traitement des insectes avec les dsRNAs d'intérêt	104
3.1.	Traitement des blattes <i>Periplaneta americana</i> avec les dsRNAs d'intérêt par ingestion	105

3.2.	Traitement des pucerons <i>Acyrtosiphon pisum</i> avec les dsRNAs d'intérêt	105
3.2.1.	Traitement des pucerons adultes par application topique des dsRNAs d'intérêt.....	105
3.2.2.	Traitement des larves de pucerons par ingestion des dsRNAs d'intérêt	106
4.	Evaluation de l'efficacité des dsRNAs d'intérêt	106
4.1.	Quantification de l'expression des gènes d'intérêt par qPCR	106
4.1.1.	Dissection des blattes <i>Periplaneta americana</i> et prélèvement du dernier ganglion abdominal.....	107
4.1.2.	Obtention des ADNc nécessaires à la quantification par qPCR	107
4.1.3.	Analyse par qPCR de l'expression des gènes d'intérêt	107
4.2.	Evaluation de l'effet des dsRNA-ApisumAChE1 sur l'activité enzymatique de l'AChE du puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i>	109
4.2.1.	Dosage de l'activité enzymatique de l'AChE selon la méthode d'Ellman	109
4.2.2.	Dosage protéique selon la méthode de Bradford	110
5.	Evaluation de l'effet des dsRNAs d'intérêt comme bioinsecticide ou comme modulateur de l'efficacité d'un insecticide	111
5.1.	Exposition des blattes <i>Periplaneta americana</i> à une dose sub létale d'imidaclopride.....	111
5.2.	Intoxication aiguë des insectes à l'imidaclopride	111
5.2.1.	Intoxication aiguë des blattes <i>Periplaneta americana</i> adultes à l'imidaclopride	111
5.2.2.	Intoxication aiguë des pucerons <i>Acyrtosiphon pisum</i> , aux stades larvaire et adulte, à l'imidaclopride.....	112
5.3.	Intoxication aiguë du puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i> au pirimicarbe.....	113
6.	Evaluation de l'impact de l'ingestion de dsRNA-Pamea7 sur la réponse calcique des nAChRs de blatte	113
6.1.	Principe de la technique d'imagerie calcique	113
6.2.	Mise en culture à court terme des neurones DUM de blatte	114
6.3.	Enregistrement de la concentration intracellulaire calcique basale d'un neurone DUM isolé.....	115
6.4.	Préparation des solutions perfusées.....	115
7.	Analyses statistiques.....	116
Résultats.....	117	
Etude 1 : Utilisation des dsRNAs ciblant la sous-unité nicotinique divergente β2 pour lutter contre le puceron du pois <i>Acyrtosiphon pisum</i> aux stades larvaire et adulte	117	
1. Synthèse de l'article	117	
2. Article publié	118	
Etude 2 : Evaluation de l'utilisation des dsRNAs qui ciblent l'acétylcholinestérase de type 1 du puceron du pois <i>Acyrtosiphon pisum</i> pour mimer les effets des insecticides inhibant cette enzyme ou en complément de ces derniers (étude préliminaire).....	133	
1. Contexte et objectifs de l'étude.....	133	
2. Effet des dsRNA-ApisumAChE1 sur l'expression des transcrits de l'AChE1.....	133	
3. Effet des dsRNA-ApisumAChE1 sur l'activité enzymatique de l'AChE du puceron.....	134	

4.	Evaluation de l'utilisation des dsRNA-ApisumAChE1 comme bioinsecticide	135
5.	Evaluation de la toxicité aiguë du pirimicarbe sur le puceron.....	136
6.	Discussion	137

Etude 3 : Utilisation de la technique d'interférence ARN dirigée contre une sous-unité nicotinique pour contourner les mécanismes d'accommodation aux insecticides : exemple de la sous-unité nicotinique Pameβ1 chez la blatte *Periplaneta americana* accommodée à l'imidaclopride..... 139

1.	Synthèse de l'article	139
2.	Article accepté pour publication	140

Etude 4 : Evaluation de l'implication de la sous-unité nicotinique Pameα7 dans la sensibilité à l'imidaclopride de la blatte *Periplaneta americana* (étude préliminaire) 164

1.	Contexte et objectifs de l'étude.....	164
2.	Effet des dsRNA-Pameα7 sur l'expression des transcrits de la sous-unité nicotinique Pameα7.....	165
3.	Evaluation de l'effet de l'ingestion des dsRNA-Pameα7 sur la sensibilité de la blatte à l'imidaclopride	166
4.	Quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la diminution de sensibilité des blattes à l'imidaclopride après l'ingestion de dsRNA-Pameα7 ?.....	167
4.1.	Impact de l'ingestion des dsRNA-Pameα7 sur l'expression des autres sous-unités nicotiniques identifiées chez la blatte	167
4.2.	Impact de l'ingestion des dsRNA-Pameα7 sur la réponse calcique des nAChRs des neurones DUM de blattes.....	168
4.2.1.	Evaluation de la réponse calcique des nAChRs présents sur les neurones DUM de la blatte.....	168
4.2.2.	Evaluation de la sensibilité à l'α-bgt des nAChRs des neurones DUM de blatte.....	169
4.2.3.	Effet de l'ingestion de dsRNA-Pameα7 sur la réponse calcique des neurones DUM de blatte.....	169
5.	Discussion	170

Discussion générale et perspectives..... 172

1.	L'utilisation de la technique d'interférence ARN qui cible les acteurs du système cholinergique peut-elle être envisagée pour lutter contre les insectes ravageurs ?.....	172
2.	Quelles sont les autres cibles potentielles de l'interférence ARN au sein du système cholinergique de l'insecte ?	173
2.1.	Les autres sous-unités nicotiniques de l'insecte	173
2.1.1.	Pharmacologie et composition en sous-unités nicotiniques des nAChRs d'insecte.....	173
2.1.2.	Les autres sous-unités nicotiniques divergentes	174
2.1.3.	Les sous-unités nicotiniques impliquées dans les phénomènes de résistance aux insecticides	174
2.1.4.	Implication des phénomènes de compensation en réponse à un ARN interférent	175
2.2.	Les protéines auxiliaires	176
3.	Comment augmenter l'efficacité des dsRNAs chez l'insecte pour la mise en place d'un produit formulé ?	176

Bibliographie.....	178
Table des figures	215
Table des tableaux.....	218

Liste des abréviations

- **α** -

α-bgt = α-bungarotoxine

- **A** -

AC = Adénylate cyclase

ace1 = Gène qui code pour l'acétylcholinestérase 1

ace2 = Gène qui code pour l'acétylcholinestérase 2

ACET = Acétamipride

ACh = Acétylcholine

AChBP = « Acetylcholine Binding Protein »

AChE = Acétylcholinestérase

ADN = Acide Désoxyribonucléotidique

Ago = Protéine Argonaute

Ala = Alanine

AM = Groupement acétoxyméthylester

AMPc = Adénosine-monophosphate cyclique

ApisumAChE = Acétylcholinestérase du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*

Arg = Arginine

ARN = Acide Ribonucleotidique

ARNi = Interférence ARN

ARNm = ARN messenger

Asn = Asparagine

Asp = Aspartate

ATC = Acétylthiocholine

ATP = Adénosine triphosphate

- **B** -

BET = Bromure d'Ethidium

- **C** -

CaM = Calmoduline

CaMK = Protéine kinase dépendante du complexe Ca²⁺-calmoduline

CaMKII = Protéine kinase dépendante du complexe Ca²⁺-calmoduline de type II

CaMKII-E = Isoforme E de la protéine kinase dépendante du complexe Ca²⁺-calmoduline de type II

CE = Carboxylestérase

CE₅₀ = Concentration d'agoniste induisant 50% de l'effet maximal
CI₅₀ = Concentration d'antagoniste inhibant 50% de l'effet maximal
CL₂₅ = Concentration induisant 25% de mortalité
CL₅₀ = Concentration induisant 50% de mortalité
CLO = Clothianidine
CYP450 = Cytochrome P450
Cys = Cystéine
CysLGIC = « Cys-loop ligand-gated ion channels »

- D -

DAG = Diacylglycérol
Dcr = Protéine Dicer
DGA = Dernier Ganglion Abdominal
DhβE = Dihydro-β-érythroidine
DL₅₀ = Dose létale entraînant 50% de mortalité
DmAChE = Acétylcholinestérase de la mouche *Drosophila melanogaster*
dsRBD = « dsRNA-binding domain »
dsRBP = « dsRNA-binding protein »
dsRNA = « double-stranded RNA » ou ARN double brin
dsRNA-ApisumAChE1 = dsRNA qui cible l'acétylcholinestérase 1 du puceron *Acyrtosiphon pisum*
dsRNA-Apisumβ2 = dsRNA qui cible la sous-unité nicotinique Apisumβ2 du puceron *Acyrtosiphon pisum*
dsRNA-LacZ = dsRNA qui cible un gène bactérien codant pour la β-galactosidase
dsRNA-Pamea7 = dsRNA qui cible la sous-unité nicotinique Pamea7 de la blatte *Periplaneta americana*
dsRNA-Pameβ1 = dsRNA qui cible la sous-unité nicotinique Pameβ1 de la blatte *Periplaneta americana*
DTNB = 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic Acid)
DUF = « Domain of unknown function »
DUM = « Dorsal Unpaired Median »

- E -

EC = Extracellulaire

- G -

GABA = Acide γ-aminobutyrique
GABAR = Récepteur GABAergique
GC = Guanylate cyclase
Gln = Glutamine
Glu = Acide glutamique
Gly = Glycine
GMPc = Guanosine-monophosphate cyclique
GPI = Glycosylphosphatidylinositol
GST = Glutathion S-transférase
GTP = Guanosine triphosphate

- H -

His = Histidine

- I -

IC = Intracellulaire

Ile = Isoleucine

I_{max} = Amplitude maximale du courant ionique

IP3 = Inositol-triphosphate

IP3R = Récepteur à l'inositol-triphosphate

IMI = Imidaclopride

- K -

kb = Kilobase

- L -

Leu = Leucine

Loqs = Protéine Loquacious

LP = Liquide physiologique

Lys = Lysine

- M -

mAChR = Récepteur cholinergique de type muscarinique

Met = Méthionine

miRNA = microRNA

MLA = Méthyllycaconitine

MoA = Mode d'action

- N -

nAChR = Récepteur cholinergique de type nicotinique

NAM = Modulateur allostérique négatif

Na_v = Canal sodique dépendant du potentiel

NIC = Nicotine

- P -

PAM = Modulateur allostérique positif

pb = Paire de bases

Phe = Phénylalanine

PIP2 = Phosphatidylinositol-biphosphate

piRNA = « PIWI-associated RNA »

PIWI = « P-element Induced WImpy testis »

PKA = Protéine kinase dépendante de l'AMPc

PKC1 = Protéine kinase C 1

PKC2 = Protéine kinase C 2

PKG = Protéine kinase dépendante du GMPc

PLC = Phospholipase C

PMA = Phorbol-myristate acetate

PP2B = Protéine phosphatase dépendante du complexe calcium-calmoduline de type 2B

PPSE = Potentiel post-synaptique exciteur

Pro = Proline

- Q -

qPCR = PCR quantitative

- R -

rDNASE = DNase recombinante

RdRP = « RNA-dependent RNA Polymerase » ou ARN polymérase dépendante de l'ARN

RE = Réticulum endoplasmique

RISC = « RNA-induced silencing complex »

RR = « Resistance Ratio »

- S -

SAM = Modulateur allostérique silencieux

Ser = Sérine

Sid = Protéine « Systemic RNA interference defective »

Sil1 = Gène « *Sid-1-like* »

siRNA = « short interfering RNA »

SNC = Système nerveux central

SNP = Système nerveux périphérique

- T -

TcAChE = Acétylcholinestérase de *Torpedo californica*

THI = Thiadipride

THIAM = Thiaméthoxame

Thr = Thréonine

Trp = Tryptophane

Tyr = Tyrosine

- V -

Val = Valine

VLP = « Virus-like particle » ou Particule pseudo-virale

Préambule

D'après les Nations Unies, la population mondiale a atteint les huit milliards d'habitants le 15 novembre 2022. De ce fait, elle a triplé en moins de cent ans et pourrait atteindre onze milliards d'ici la fin du XXI^{ème} siècle (Nations Unies, Département des Affaires Economiques et Sociales, La Division de la Population, 2022). Cette explosion démographique s'accompagne de nouveaux enjeux économiques et sociétaux majeurs tels que l'augmentation de la production agricole actuelle pour répondre aux besoins alimentaires croissants. L'augmentation des rendements agricoles nécessaire est difficile à estimer et varie selon les modèles prédictifs utilisés mais il semblerait qu'une augmentation de 60% d'ici 2050 soit indispensable pour assurer la sécurité alimentaire de la population en pleine croissance (van Dijk *et al.*, 2021). La protection des cultures contre les bioagresseurs, tels que les insectes ravageurs, a permis d'augmenter ces rendements. Encore aujourd'hui, le contrôle des populations d'insectes ravageurs se base principalement sur la lutte chimique, c'est-à-dire sur l'utilisation d'insecticides. Cependant, leur utilisation est aujourd'hui décriée notamment à cause de leurs effets néfastes sur la santé humaine et animale ainsi que sur l'environnement. Entre autres, un lien a pu être établi entre une exposition répétée à de fortes doses d'insecticides et le déclenchement de maladies neurodégénératives (Narayan *et al.*, 2017). Des effets délétères de ces composés sur des organismes non-cibles comme l'abeille *Apis mellifera*, un insecte indispensable à l'agriculture et au maintien d'un écosystème varié, ont également pu être rapportés (Leska *et al.*, 2021). De plus, l'utilisation massive et non raisonnée des insecticides a conduit à l'augmentation du nombre d'espèces d'insectes résistants (Sparks *et al.*, 2021) et accommodés (Bantz *et al.*, 2018) se traduisant par une diminution globale de l'efficacité de ces composés. En ce sens, il apparaît urgent de restructurer les stratégies de contrôle des populations d'insectes ravageurs qui se basent sur l'utilisation d'insecticides. C'est pourquoi, en France, de nouvelles directives gouvernementales ont émergées comme le plan Ecophyto II+. Ce dernier a pour objectif de réduire l'utilisation des produits phytopharmaceutiques, comme les insecticides, de 50% d'ici 2025 ainsi que de favoriser la recherche et le développement de nouvelles stratégies de lutte innovantes. Parmi ces stratégies innovantes, la technique d'interférence ARN présente un intérêt tout particulier. En effet, contrairement aux insecticides qui agissent sur un spectre large d'insectes, l'interférence ARN est décrite comme pouvant cibler spécifiquement un gène donné d'une espèce d'insecte.

Ce travail de thèse se concentre sur l'utilisation dans la lutte contre les insectes ravageurs de la technique d'interférence ARN dirigée contre les acteurs du système cholinergique, qui sont des cibles de nombreuses familles d'insecticides.

Introduction

Chapitre 1 : Le système cholinergique de l'insecte

1. Généralités sur le système cholinergique

Depuis son identification il y a plus de cent ans, l'acétylcholine (ACh, 2-acétyloxy-N,N,N-triméthylethanaminium) s'est avérée jouer un rôle primordial dans de nombreuses fonctions essentielles au maintien de l'état physiologique des organismes (Bertrand et Wallace, 2020). L'ACh a été synthétisée pour la première fois par Adolf von Baeyer en 1867, bien avant que son rôle biologique n'ait été élucidé. En 1921, Otto Loewi démontre en stimulant le nerf vague parasympathique qui innerve le cœur de grenouille, que la transmission de l'excitation nerveuse au niveau des terminaisons nerveuses se faisait par voie chimique. Ce n'est que 15 ans plus tard, que Henry Dale et ses collaborateurs ont démontré que l'ACh agissait comme un neurotransmetteur au niveau de la jonction neuromusculaire (Dale *et al.*, 1936). Les travaux de Loewi et Dale ont été récompensés par un prix Nobel de physiologie ou médecine en 1936. Il est aujourd'hui admis que l'ACh présente un rôle de neurotransmetteur dans le système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) comme au niveau des jonctions neuromusculaires chez les vertébrés (Fisher et Wonnacott, 2012). En revanche, chez les insectes, l'ACh est principalement retrouvée dans le SNC et ne semble pas être impliquée dans la transmission neuromusculaire de l'influx nerveux. A l'instar du glutamate chez les vertébrés, l'ACh est supposée être le neurotransmetteur excitateur principal du SNC de l'insecte (Millar et Denholm, 2007). Cette affirmation a pu être attestée entre autres chez l'abeille *Apis mellifera* (Oleskevich, 1999), la mouche *Drosophila melanogaster* (Lee et O'Dowd, 1999), la sauterelle *Omocestus viridulus* (Heinrich *et al.*, 1997) ou encore le criquet *Locusta migratoria* (Gauglitz et Pflüger, 2001). L'ACh est synthétisée à partir de la choline et de l'acétyl-CoA par l'intermédiaire de la choline acétyltransférase, une enzyme présente dans différents neurones ainsi que dans des cellules non-neuronales (Wessler et Kirkpatrick, 2008; Schubert *et al.*, 2012). Au sein d'une synapse cholinergique, l'ACh est libérée dans la fente synaptique et se lie aux récepteurs cholinergiques de type nicotinique (nAChR) et muscarinique (mAChR) qui sont largement distribués au sein du SNC. Le tissu nerveux des insectes est l'une des sources les plus riches en nAChRs neuronaux (Breer et Sattelle, 1987). La quantité d'ACh présente au sein d'une synapse cholinergique est régulée par une enzyme, l'acétylcholinestérase (AChE). L'AChE hydrolyse l'ACh et permet le recyclage de la choline au niveau du neurone pré-synaptique (Massoulié, 2002; Thapa *et al.*, 2017). Cette méthode de régulation est inhabituelle et suggère que l'ACh est finement régulée dans le temps pour maintenir une quantité optimale de ce neurotransmetteur nécessaire aux fonctions de bases qui lui sont associées (Fisher et Wonnacott, 2012). Ces différents éléments sont indispensables au bon fonctionnement de la synapse cholinergique (figure 1). De ce fait, l'importance du système cholinergique pour la physiologie des organismes, et notamment des insectes, en fait une cible de choix des produits phytopharmaceutiques pour contrôler les populations de bioagresseurs (Casida et Durkin, 2013a; Casida, 2018; Matsuda *et al.*, 2020). Dans ce chapitre, seuls les nAChRs et l'AChE sont abordés.

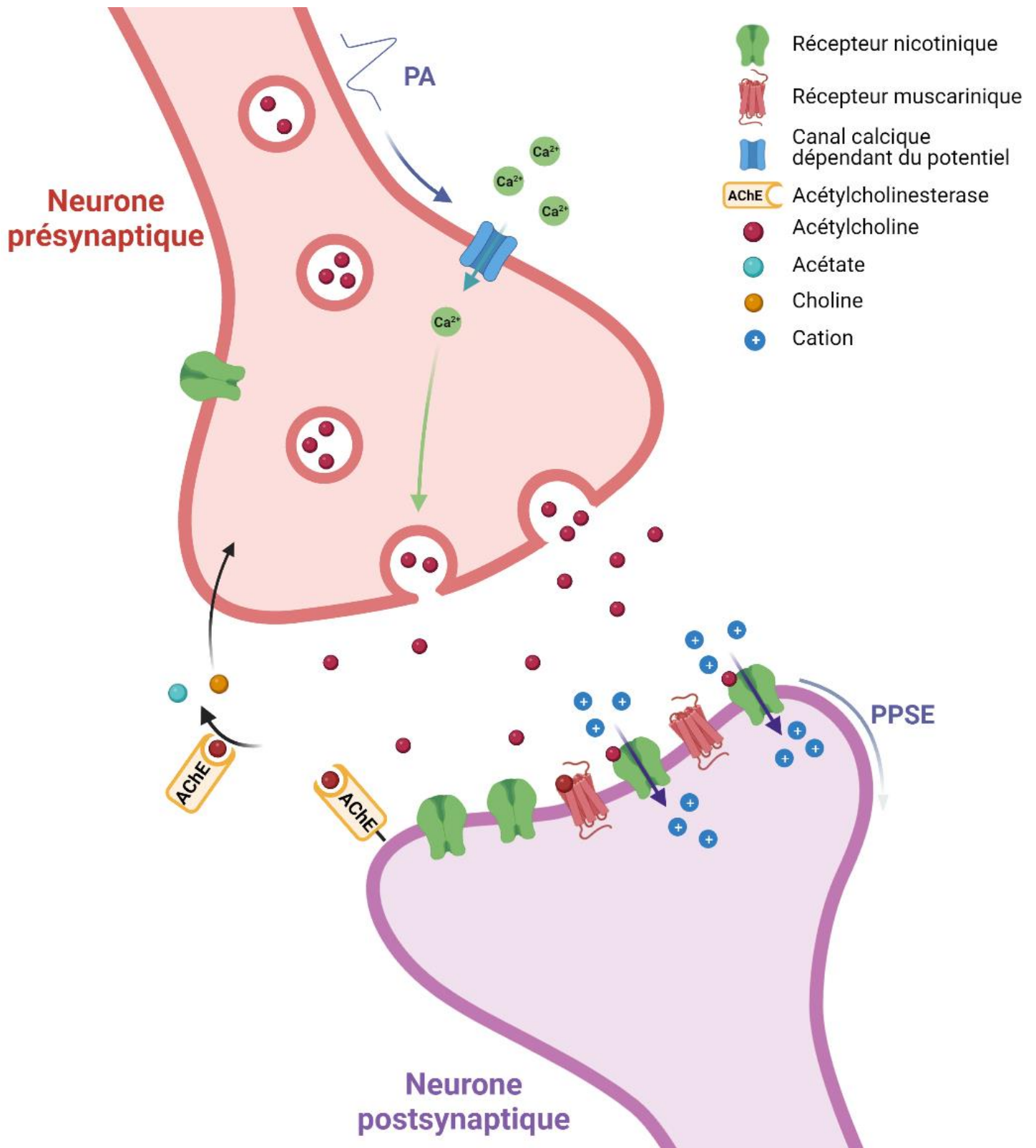


Figure 1 : Représentation schématique d'une synapse cholinergique et des différents éléments cellulaires et moléculaires impliqués dans la transmission rapide de l'influx nerveux. L'arrivée d'un potentiel d'action (PA) au niveau du neurone présynaptique va activer des canaux calciques dépendants du potentiel et engendrer un flux entrant de Ca^{2+} . Ces ions vont favoriser l'exocytose d'acétylcholine dans la fente synaptique. Ce neurotransmetteur va activer des récepteurs cholinergiques de type muscarinique et nicotinique sur le neurone postsynaptique. Les récepteurs nicotiniques vont notamment induire un flux net entrant de cations dans le neurone postsynaptique et générer un potentiel postsynaptique excitateur (PPSE) qui se propagera de façon décémentielle. Enfin, l'acétylcholinestérase va hydrolyser l'acétylcholine dans la fente synaptique en acétate et choline qui sera recyclée par le neurone présynaptique.

2. Les récepteurs cholinergiques de type nicotinique

2.1. Découverte et généralités sur les récepteurs nicotiniques

Au début du XX^{ème} siècle, John Newport Langley a observé que l'application de nicotine (NIC) déclenchait la contraction tonique du muscle squelettique dorsal de la patte, ou muscle gastrocnémien, de la grenouille et que l'application de curare inhibait cette contraction (Langley, 1905). A partir de ces observations, il a pu émettre l'hypothèse que la NIC et le curare se combinaient avec une « substance réceptrice » qui n'était pas la molécule contractile à proprement parler mais qui pouvait l'influencer (Langley, 1907). Il a noté que cette « substance réceptrice » se trouvait proche d'une « substance synaptique ». La théorie de la « substance réceptrice » de Langley a évolué vers la théorie des récepteurs, qui est aujourd'hui l'un des principes de base de la biologie moderne. En 1914, l'étude pharmacologique de Henry Dale a permis de mettre en évidence deux « actions » différentes de l'ACh. Une première dite « muscarinique » qui pouvait être mimée par l'application de muscarine et qui était bloquée par l'atropine ; et une deuxième « nicotinique » qui était mimée par l'application de NIC en présence d'atropine (Dale, 1914). Aujourd'hui, il est admis que ces différentes actions de l'ACh sont associées à deux familles de récepteurs cholinergiques pharmacologiquement et fonctionnellement distinctes que sont les mAChRs et nAChRs respectivement. Les études sur les nAChRs qui ont suivi ont été réalisées sur l'organe électrique de l'anguille *Electrophorus electricus*. Cet organe permet de produire d'importantes décharges électriques grâce aux milliards de terminaisons nerveuses libérant de fortes quantités d'ACh et au nombre conséquent de nAChRs de type musculaire présents. En 1970, Jean-Pierre Changeux et ses collaborateurs ont pu identifier un nAChR en inhibant l'action d'un agoniste cholinergique, la carbamylcholine, sur l'électroplaque isolée d'anguille (*in vivo*) et sur des fragments de membranes (*in vitro*) en utilisant l' α -bungarotoxine (α -bgt), une toxine du serpent *Bungarus multicinctus* (Changeux *et al.*, 1970). Dans les années qui ont suivi, ce nAChR a été le premier récepteur à être purifié (Kasai et Changeux, 1971; Olsen *et al.*, 1972; Meunier *et al.*, 1974) et son poids moléculaire a également pu être déterminé (Hucho et Changeux, 1973). En parallèle, d'autres collaborations ont abouti à la purification d'un récepteur similaire à partir de l'organe électrique de torpille *Torpedo marmorata* (Cartaud *et al.*, 1973). Quelques années plus tard, la partie aminoterminal de la sous-unité α du nAChR de la torpille a pu être séquencée (Devillers-Thiery *et al.*, 1979). La séquence codante complète de cette sous-unité a ensuite été obtenue (Devillers-Thiery *et al.*, 1983). Après le clonage des nAChRs de *Torpedo*, des sous-unités nicotiniques de nAChRs ont été clonées à partir de nombreuses autres espèces. En effet, les sous-unités des nAChRs de type musculaire (α 1, β 1, γ , δ et ϵ) et neuronal de vertébrés (α 2- α 10, β 2- β 4) ont pu être clonées (Millar, 2009). Puis en 1984 et pour la première fois, un nAChR fonctionnel a pu être exprimé dans un système hétérologue à partir d'ADNc issus de la torpille *Torpedo californica* (Mishina *et al.*, 1984). Enfin, l'identification et le séquençage des sous-unités qui composent les nAChRs d'insectes ont été possibles notamment chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1986; Jones et Sattelle, 2010). Aujourd'hui, on peut définir les nAChRs comme des récepteurs canaux. La fixation d'un ligand endogène comme l'ACh ou exogène comme la NIC entraîne l'ouverture du canal et le passage de cations (Na^+ , K^+ et Ca^{2+}) à travers la membrane cellulaire (figure 2). Lorsqu'ils se situent sur un neurone postsynaptique, leur activation induit un flux net de cations entrant dans la cellule et génère un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE). De ce fait, ils permettent la transmission rapide de l'influx nerveux (Thany et Tricoire-Leignel, 2011). Les nAChRs peuvent également être

présynaptiques. Dans ce cas, ils vont être impliqués dans la modulation, positive ou négative, de la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Thany et Tricoire-Leignel, 2011; Pyakurel *et al.*, 2018).

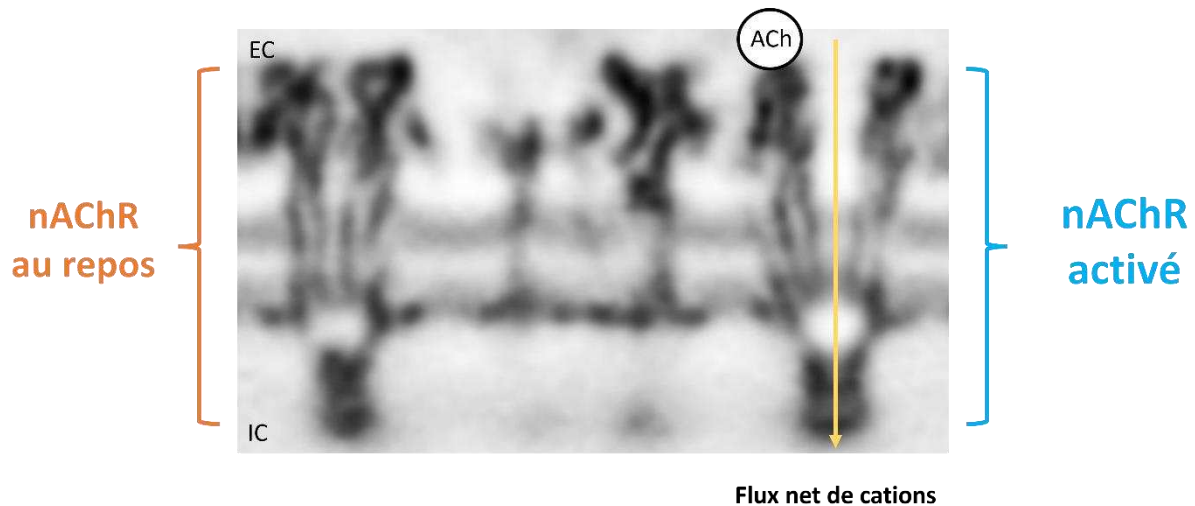


Figure 2 : Photographie d'un nAChR. La photographie correspond à une coupe transversale d'une membrane cholinergique de la torpille *Torpedo marmorata* en microscopie électronique. Le nAChR de gauche est au repos et son canal est fermé. Après la fixation de l'ACh sur le récepteur, celui-ci va s'activer. Dans cet état, le canal est ouvert (nAChR de droite) et permet le passage d'un flux net de cations entrant dans la cellule. ACh = acétylcholine ; EC = extracellulaire ; IC = intracellulaire ; nAChR = récepteur nicotinique. Modifiée d'après Unwin, 2022.

2.2. Structure tridimensionnelle des récepteurs nicotiques

2.2.1. Structure générale des récepteurs nicotiques

Le nAChR de l'organe électrique a été l'un des premiers récepteurs à être purifié, cloné et exprimé. Ainsi, il a été une source importante de matériel pour les études visant à élucider la structure du nAChR. Sur une période de plusieurs années, la structure tridimensionnelle du nAChR de l'organe électrique a été observée avec une résolution de plus en plus élevée allant jusqu'à 4Å en microscopie électronique (Unwin, 2005). Grâce à ces études, le nAChR est l'une des premières protéines transmembranaires pour laquelle des données structurales tridimensionnelles à haute résolution ont été disponibles. L'élucidation de sa structure ainsi que celle d'autres protéines transmembranaires a permis de regrouper les nAChRs neuronaux au sein d'une superfamille de récepteurs ionotropes dépendants de la liaison d'un ligand qui présentent un motif « Cys-Loop » (cysLGIC). Chez les vertébrés, cette superfamille regroupe notamment, en plus des nAChRs, les récepteurs à l'acide γ -aminobutyrique (GABAR), à la glycine ou encore à la sérotonine (Jones et Sattelle, 2010; Jones, 2018). En revanche, chez les invertébrés, cette superfamille regroupe également les récepteurs au glutamate perméables aux ions chlorures, à l'histamine, à la dopamine et à la tyramine (Matsuda *et al.*, 2020). La structure de base des nAChRs neuronaux est homologue à celle des nAChRs musculaires (Papke, 2014; Dani, 2015). Les nAChRs sont des glycoprotéines transmembranaires constituées de cinq sous-unités nicotiques homologues arrangées en anneau perpendiculairement à la membrane pour former un canal ionique central

(figure 3A). L'agencement des sous-unités nicotiques permet de diviser le récepteur en trois domaines distincts (figure 3B ; Unwin, 2005; Sine et Engel, 2006; Albuquerque *et al.*, 2009; Unwin, 2013; Dani, 2015):

- un domaine extracellulaire d'environ 70Å, principalement composé de feuillets β , qui définit l'entrée du pore ionique ainsi qu'un premier vestibule sur lequel sont retrouvés les sites de liaisons à l'ACh ;
- un domaine membranaire d'environ 30Å composé d'hélices α où se trouve un passage plus étroit en continuité de l'ouverture du pore ;
- un domaine intracellulaire composé d'hélices α amphiphiles qui délimitent un deuxième vestibule en forme de cône inversé.

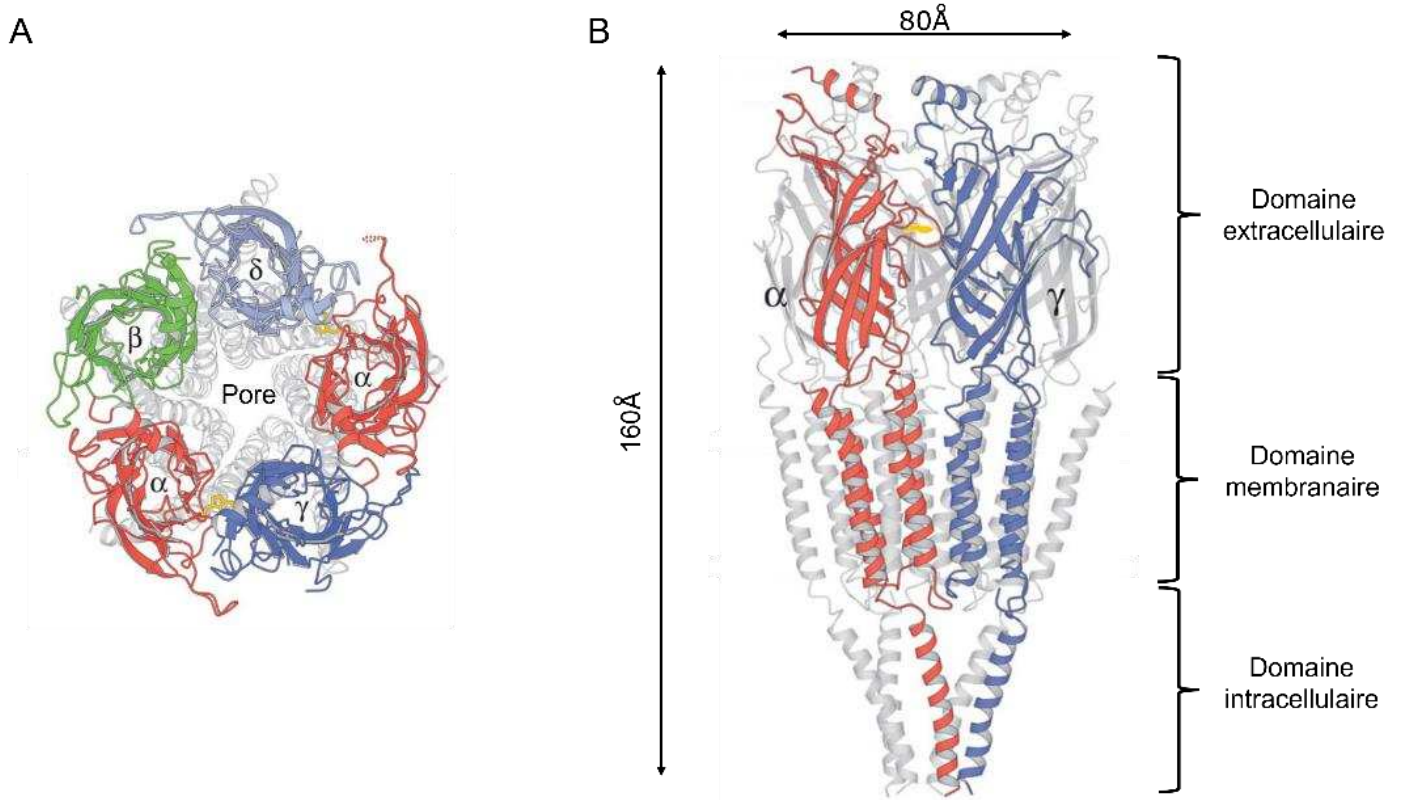


Figure 3 : Structure générale d'un nAChR. Le nAChR est représenté en (A) vue du dessus où les sous-unités nicotiques s'arrangent pour former un canal ionique central, et en (B) vue de profil où les domaines du récepteur sont différenciables. Modifiée d'après Unwin, 2005.

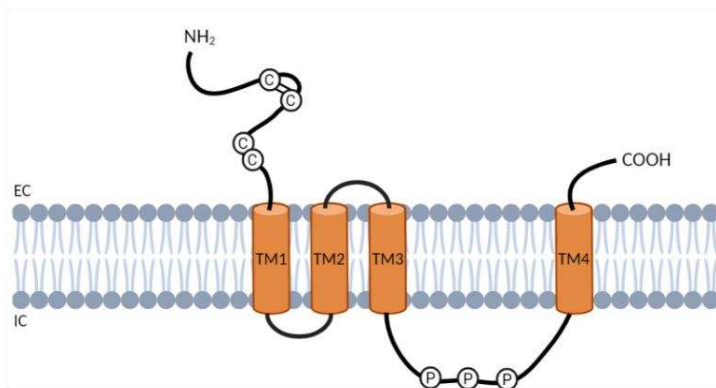
2.2.2. Structure des sous-unités nicotiques

Les nAChRs formés par l'assemblage des sous-unités nicotiques sont dits « homomériques » s'ils sont composés uniquement de sous-unités identiques ou « hétéromériques » si au moins deux sous-unités différentes sont présentes. Les nAChRs musculaires peuvent être composés de sous-unités α et non- α qui sont nommées β , δ , ϵ ou γ . Les nAChRs neuronaux, qui sont notamment retrouvés en grande quantité chez les insectes, sont quant à eux exclusivement composés de sous-unités α et β (Jones et Sattelle, 2010; Dani, 2015). Toutes les sous-unités nicotiques ont une structure similaire (figure 4A) :

- un long domaine N-terminal hydrophile extracellulaire ;
- quatre domaines transmembranaires hydrophobes nommés TM1 à TM4 ;
- une boucle intracellulaire reliant les TM3 et TM4 de taille variable ;
- un court domaine C-terminal hydrophile extracellulaire.

La partie N-terminale extracellulaire possède la structure la plus complexe. Elle commence par une hélice α amino-terminale nommée $\alpha 1$ qui est directement attachée à un premier brin β nommé $\beta 1$. Au total, dix brins β sont retrouvés dans la partie N-terminale de la sous-unité nicotinique et constituent le cœur du domaine extracellulaire. Ils sont agencés en « sandwich » avec les brins $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ et $\beta 8$ qui forment les feuillets β « intérieurs » et les brins $\beta 4$, $\beta 7$, $\beta 9$ et $\beta 10$ formant les feuillets β « extérieurs ». Deux acides aminés cystéines espacés de treize acides aminés sont également retrouvés dans cette extrémité amino-terminale. Elles permettent la création d'un pont disulfure entre leur groupement thiol pour ainsi former une boucle cystéine ou « Cys-Loop » qui est commune à tous les récepteurs appartenant à la superfamille des cysLGIC. Cette boucle est notamment impliquée dans l'assemblage des sous-unités (Green et Wanamaker, 1997) ainsi que dans la cinétique d'ouverture du canal (Albuquerque *et al.*, 2009). Deux cystéines adjacentes supplémentaires et indispensables pour la liaison de l'ACh sur le récepteur sont présentes dans le domaine extracellulaire des sous-unités α (Karlin *et al.*, 1986; Albuquerque *et al.*, 2009). D'autres boucles particulières sont également présentes dans la partie extracellulaire comme les boucles A, B, C, D, E et F qui sont impliquées dans la fixation du ligand au récepteur, et la boucle $\beta 1/\beta 2$ qui permet de faire le lien entre les feuillets β intérieurs et le TM2 (Unwin, 2005; Unwin, 2013). Les différents domaines transmembranaires, qui sont composés d'hélices α , sont connectés entre eux par une alternance de boucles intracellulaires et extracellulaires. On peut noter la présence d'une grande boucle intracellulaire qui relie les TM3 et TM4. Sa taille est variable (Dani, 2015) et elle présente de nombreux sites de phosphorylation où des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation peuvent intervenir, suggérant que ces phénomènes pourraient jouer un rôle important dans le fonctionnement de ce récepteur (Thany *et al.*, 2007; Raymond *et al.*, 2017). La boucle intracellulaire reliant les TM3 et TM4 comporte également une hélice α courbée amphiphile (figure 4B ; Unwin, 2005).

A



B

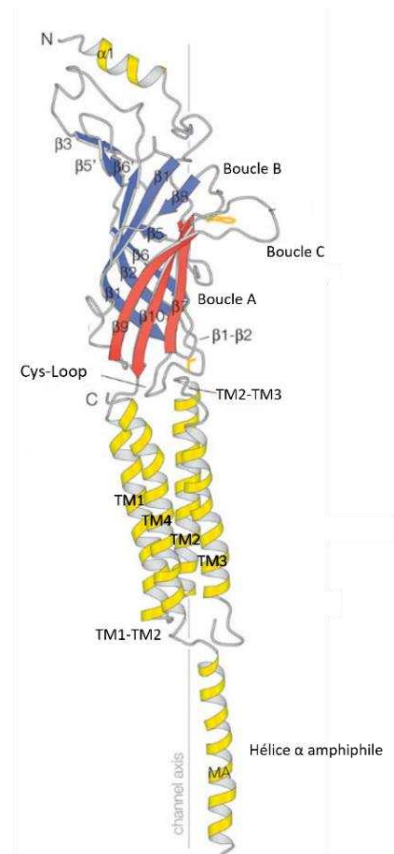


Figure 4 : Structure d'une sous-unité nicotinique. (A) Représentation schématique d'une sous-unité nicotinique α qui compose le nAChR. (B) Représentation schématique d'une sous-unité nicotinique vue de profil avec les éléments structuraux qui délimitent les domaines de la protéine. Le lien entre la boucle amphiphile et le TM3 n'est pas représenté. C = Cystéine ; EC = extracellulaire ; IC = intracellulaire ; P = site de phosphorylation ; TM = domaine transmembranaire. Modifiée d'après Unwin, 2005.

2.2.3. Structure des sites de liaison des ligands

Les sites de liaison de l'ACh, ou sites orthostériques, sont retrouvés à l'interface entre deux sous-unités nicotiniques adjacentes. La présence des deux cystéines adjacentes dans la partie amino-terminale extracellulaire spécifiques aux sous-unités α est indispensable à la liaison d'un ligand sur le récepteur (Albuquerque *et al.*, 2009). Ainsi, un nAChR fonctionnel est obligatoirement composé d'au moins deux sous-unités α . Le nombre de sites de liaison est directement dépendant de la composition en sous-unités des nAChRs. Les différentes études réalisées sur les nAChRs isolés à partir de l'organe électrique de torpille (Unwin, 2005) mais également sur une protéine nommée AChBP (« Acetylcholine Binding Protein ») sécrétée par les cellules gliales de l'escargot *Lymnaea stagnalis* (Smit *et al.*, 2001) ont permis de bâtir un socle de connaissances sur la structure des sites de liaison des ligands des nAChRs. L'AChBP est un homologue naturel soluble du domaine extracellulaire des nAChRs, et comme certains d'entre eux, elle est homopentamérique (Shahsavari *et al.*, 2016). Le site de fixation du ligand correspond à une « poche » hydrophobe séparée en deux composantes. La première composante dite principale ou positive correspond aux boucles A, B et C d'une sous-unité α . La deuxième composante dite complémentaire ou négative est, quant à elle, composée des boucles D, E et F d'une sous-unité α ou non- α (figure 5). Dans la composante principale, des acides aminés aromatiques

tyrosine et tryptophane ainsi que les deux cystéines adjacentes sont très conservés et se rassemblent à l'interface des sites de liaison. Chez la torpille, ces résidus sont Tyr93 (boucle A), Trp149 et Tyr151 (boucle B), Tyr190, Tyr198 et les résidus Cys192 et Cys193 (boucle C). Lorsqu'un ligand se fixe sur le site orthostérique, la boucle C va se déformer et recouvrir le ligand (Celie *et al.*, 2004). Dans la composante complémentaire, les Trp55 et Trp57 sont retrouvés dans la boucle D (Sine et Engel, 2006; Taly *et al.*, 2009; Unwin, 2013). Les résidus aromatiques retrouvés dans les boucles A, B, C et D permettent de créer une « boîte aromatique » où l'ammonium quaternaire de l'ACh est chélaté. Dans les nAChRs musculaires, la création d'une liaison cation- π , c'est-à-dire une interaction non-covalente entre un cation et un système riche en électron, entre l'acide aminé tryptophane de la boucle B et l'amine quaternaire de l'ACh participe à la fixation du ligand (Taly *et al.*, 2009). Au sein du nAChR neuronal $\alpha 4\beta 2$, ce type de liaison est notamment responsable de la haute affinité de la NIC pour le récepteur. Le groupement acétyle de l'ACh interagit quant à lui avec les boucles E et F de la composante complémentaire dont la séquence est très variable selon les nAChRs (Corringer *et al.*, 2012). En général, les résidus hydrophobes de la composante principale déterminent l'affinité du ligand, tandis que les résidus apportés par la composante complémentaire déterminent la sélectivité du ligand (Albuquerque *et al.*, 2009).

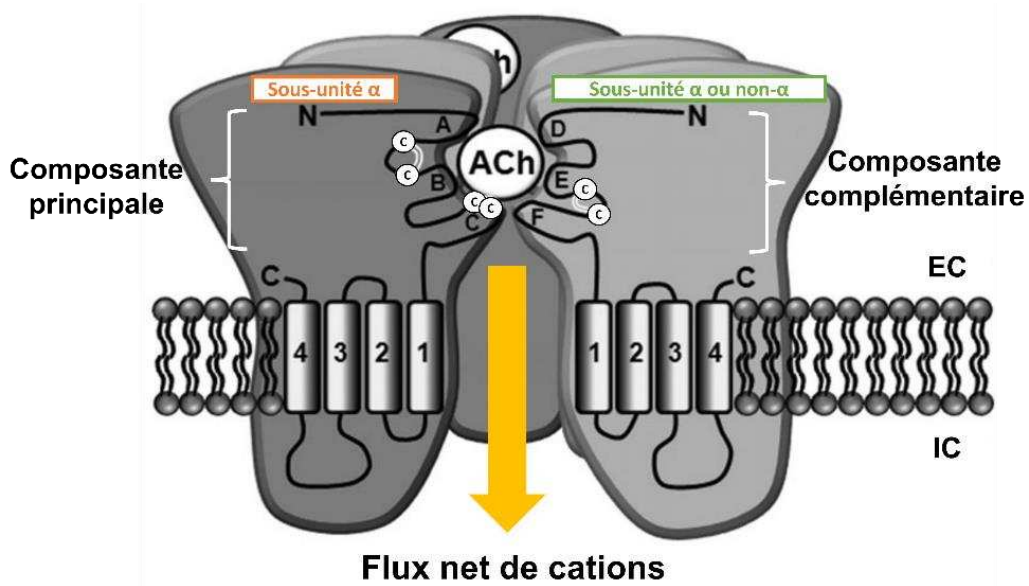


Figure 5 : Représentation schématique d'un nAChR et d'un site de fixation de l'ACh. Les composantes principale et complémentaire, composées des boucles A, B, C et E, F, G respectivement, sont représentées sur les sous-unités du récepteur. EC = extracellulaire ; IC = intracellulaire. Modifiée d'après Jones et Sattelle, 2010.

2.2.4. Structure du pore ionique

Les cinq sous-unités nicotiques qui composent le nAChR s'arrangent de manière régulière en anneaux de telle sorte à former un canal ionique à travers la membrane. Ce canal est composé d'un pore ionique encadré par des vestibules intracellulaire et extracellulaire qui sont délimités par les boucles intracellulaires reliant les TM3 et TM4 des sous-unités nicotiques et par leurs domaines extracellulaires respectivement (figure 6A). Les TM2 des cinq sous-unités longent le pore ionique ainsi formé et les TM1, TM3 et TM4, quant à eux, font face aux lipides de la membrane. Les nAChRs existent dans un état de repos, activé et désensibilisé (Wu *et al.*, 2015). Lorsque le nAChR est à l'état de repos, c'est-à-dire en absence de tout ligand, le canal est fermé et les TM2 sont courbés vers la lumière du canal (Unwin et Fujiyoshi, 2012). Des expériences de marquage par affinité ont permis d'identifier des résidus homologues clés des TM2 qui permettent la formation d'anneaux pentamériques superposés (figure 6B ; Taly *et al.*, 2009). Les anneaux extracellulaire, intermédiaire et intracellulaire sont chargés négativement et sont impliqués dans la sélectivité ionique du canal (Corringer *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2005). Les anneaux hydrophobes constituent la partie la plus étroite du pore lorsque le canal est fermé. A ce niveau, le pore a un diamètre d'environ 6Å. En comparaison, les ions sodium ou potassium solvatés ont une taille d'environ 8Å. Ainsi, lorsque le canal est à l'état fermé, cette gaine compacte et hydrophobe constitue une véritable barrière physique et énergétique imperméable aux ions (Miyazawa *et al.*, 2003; Unwin, 2013). La fixation d'un agoniste sur le récepteur va induire des changements de conformation pour faciliter le passage des cations à travers le pore.

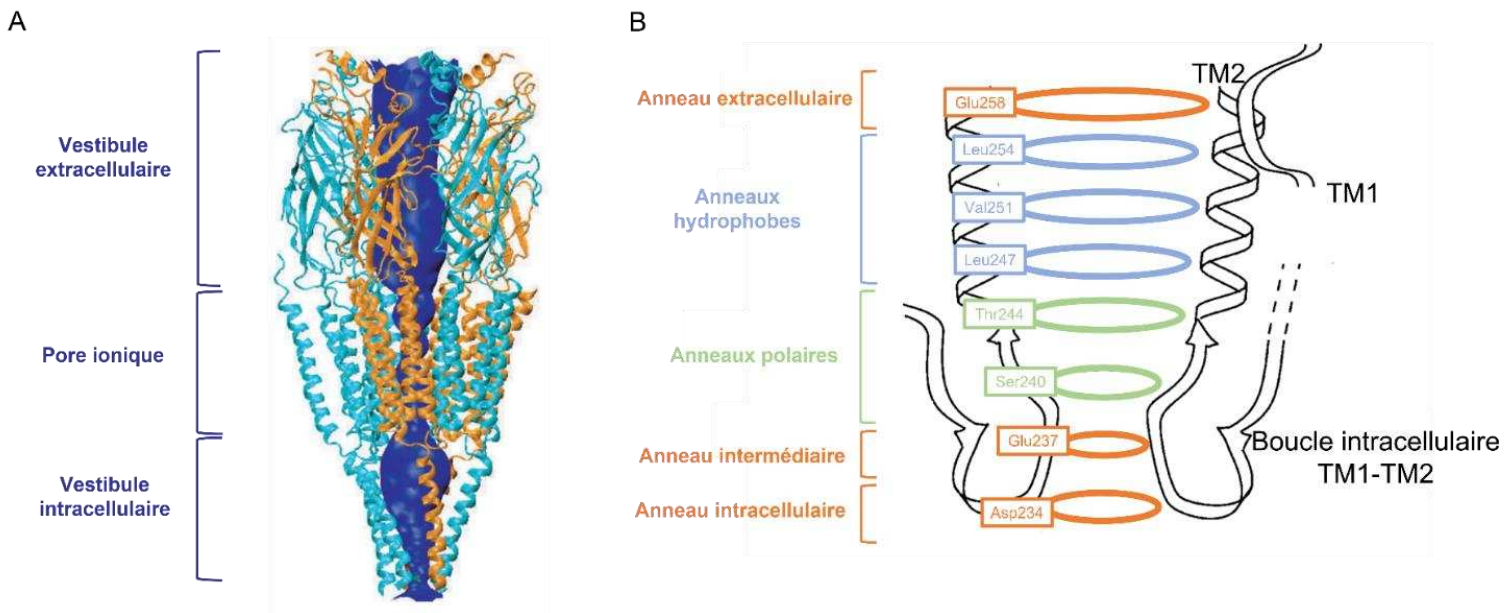


Figure 6 : Structure du pore ionique d'un nAChR. (A) Représentation schématique d'un nAChR. Les vestibules et le pore ionique qui permettent le passage sélectif des cations à travers le canal sont représentés en bleu foncé. Modifiée d'après Sine et Engel, 2006. (B) Représentation schématique du pore ionique du nAChR homomérique $\alpha 7$ de poulet à l'état ouvert. Les acides aminés formant les différents anneaux sont indiqués sur le TM2 et sur la boucle intracellulaire reliant les TM1 et TM2. Modifiée d'après Corringer *et al.*, 2000.

2.2.5. Dynamique structurale des nAChRs en réponse à la fixation d'un agoniste

Les nAChRs agissent comme des interrupteurs moléculaires qui changent de conformation lors de la liaison avec un agoniste tel que l'ACh pour permettre un flux net de cations entrant dans la cellule (Changeux et Taly, 2008). Ainsi, la fixation d'un agoniste sur le récepteur va engendrer une succession de changements conformationnels rapides conduisant à l'ouverture du canal. Comme décrit précédemment, lors de la fixation d'un agoniste sur le site orthostérique, la boucle C va recouvrir le ligand et ainsi plafonner le site de fixation (Celie *et al.*, 2004). Ce mouvement va induire la rotation des feuillets β du domaine extracellulaire des sous-unités nicotiques. Ces réarrangements seront ensuite transmis aux TM2 et TM3. Le TM2 passe alors d'une forme courbée vers la lumière du canal à étendue (figure 7 ; Unwin et Fujiyoshi, 2012). Ainsi, la section la plus étroite du pore qui se trouvait initialement au niveau des anneaux hydrophobes au centre de la bicouche lipidique, est transférée au niveau des anneaux polaires qui sont proches du milieu intracellulaire. Dans ce cas, le passage sélectif des cations solvatés est possible par la légère augmentation de la largeur de cette section du pore et par le caractère polaire et hydrophile de cette partie du canal (Unwin et Fujiyoshi, 2012; Dani, 2015). Le nAChR est ainsi à l'état ouvert. Cet état d'ouverture est instable et l'action prolongée d'un agoniste sur le récepteur peut induire son passage à un état non-conducteur ou désensibilisé (Papke, 2014).

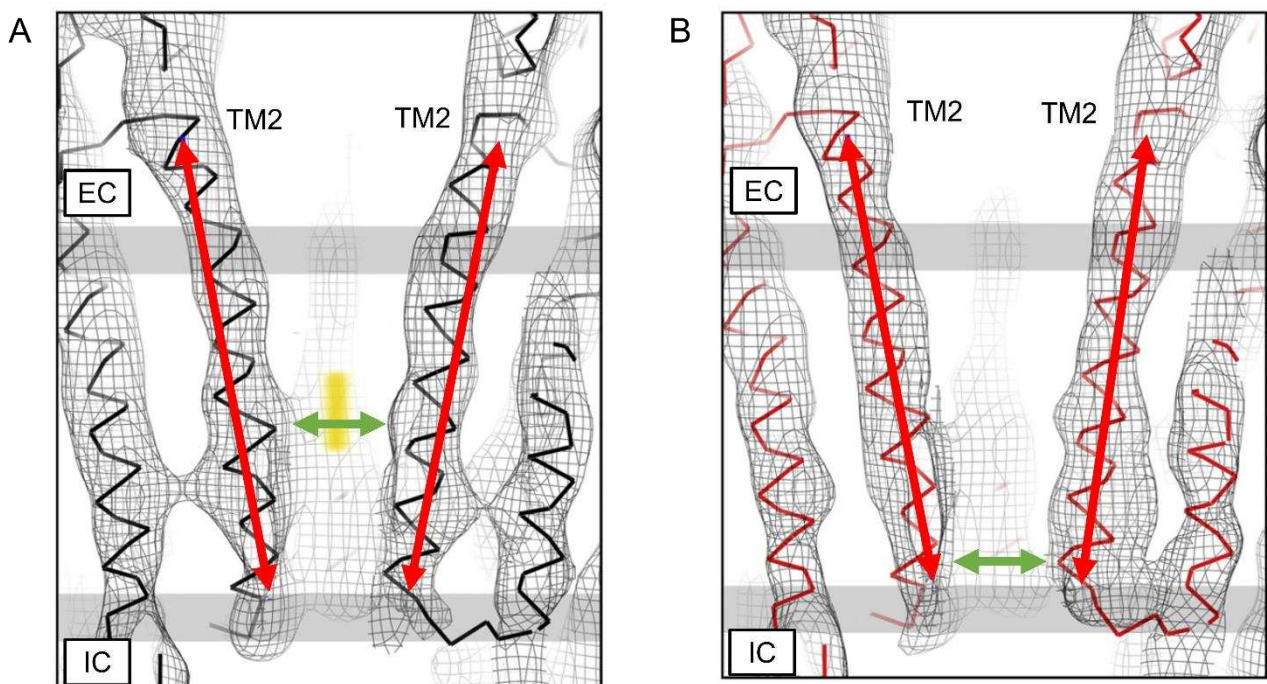


Figure 7 : Dynamique structurale des nAChRs. (A) Le nAChR est à l'état de repos et le canal est fermé. Dans ce cas, les TM2 sont courbés vers l'intérieur du canal. (B) Le nAChR est à l'état ouvert et le canal est ouvert grâce aux TM2 qui sont étendus. Les flèches rouges représentent la forme des TM2 nécessaire au passage des ions à travers le canal. La flèche verte correspond à la section la plus étroite du canal. Les barres grises horizontales représentent la bicouche lipidique de la membrane plasmique. EC = extracellulaire ; IC = intracellulaire. Modifiée d'après Unwin et Fujiyoshi, 2012.

2.3. Diversité des sous-unités nicotiniques d'insectes

2.3.1. Les sous-unités nicotiniques conservées

Les nAChRs d'insectes sont majoritairement retrouvés dans le SNC et sont principalement neuronaux chez ces invertébrés (Vo *et al.*, 2010). Ainsi, ils sont composés de sous-unités α et β . La superfamille de gènes qui code pour les sous-unités nicotiniques de la mouche *Drosophila melanogaster* a été la première à être complètement identifiée chez l'insecte. En effet, comme il a été démontré que les séquences protéiques des sous-unités nicotiniques de divers organismes présentaient des pourcentages d'identité conséquents (Corringer *et al.*, 2000), les différentes séquences de ces protéines de vertébrés ont permis d'identifier des gènes orthologues chez les insectes. Ainsi, une sous-unité nicotinique nommée ARD pour « acetylcholine receptor *Drosophila* », puis appelée D β 1 par la suite, a pu être identifiée chez la drosophile (Hermans-Borgmeyer *et al.*, 1986). Il s'agit de la première sous-unité nicotinique à avoir été identifiée chez un insecte et il a fallu presque 20 ans supplémentaires pour identifier les autres sous-unités nicotiniques de cet insecte. Le séquençage de son génome a facilité leur identification (Adams *et al.*, 2000). Plus tard, le séquençage de génomes (Holt *et al.*, 2002; Xia *et al.*, 2004; Weinstock *et al.*, 2006; Nene *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2008; The International Aphid Genomics Consortium, 2010; Harrison *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018b) et l'identification des familles de gènes qui codent pour les sous-unités nicotiniques ont pu être réalisés pour d'autres espèces d'insectes (tableau 1). Ces études ont permis de mettre en évidence, par homologie de séquence, sept groupes de sous-unités nicotiniques hautement conservés entre les espèces d'insectes (Jones *et al.*, 2007a; Jones et Sattelle, 2010) : α 1, α 2, α 3, α 4, α 5-7, β 1 et α 8/ β 2 (tableau 1). Les sous-unités α 5, α 6, et α 7 sont regroupées car elles présentent une forte homologie de séquence avec les sous-unités α 7 de vertébrés (Jones *et al.*, 2007a; Thany *et al.*, 2007). D'autres sous-unités dites « α 7-like » ont été identifiées chez le nématode (Mongan *et al.*, 2002; Williamson *et al.*, 2007) ou encore le trématode (Bentley *et al.*, 2004) suggérant une lignée ancienne et commune pour ces gènes. Les autres sous-unités nicotiniques d'insectes ne présentent pas une telle homologie avec les vertébrés. Le groupe α 8/ β 2 est composé de la sous-unité D β 2 et de ses homologues qui sont des sous-unités α . Ainsi, la sous-unité D β 2 a pu subir des changements fonctionnels au cours de son évolution (Jones et Sattelle, 2010). L'étude comparative des séquences protéiques des sous-unités nicotiniques de la mouche *Drosophila melanogaster*, du moustique *Anopheles gambiae*, du papillon *Bombyx mori*, de l'abeille *Apis mellifera* et du scarabée *Tribolium castaneum* ont permis de mettre en avant des caractéristiques particulières aux sous-unités nicotiniques d'insectes. Les sous-unités appartenant aux groupes α 1 à α 4 et α 8/ β 2 présentent un polypeptide supplémentaires de 9 à 10 acides aminés dans leur boucle F (Shimomura *et al.*, 2004; Jones et Sattelle, 2010). Une telle insertion a également pu être identifiée pour les sous-unités équivalentes des blattes *Periplaneta americana* et *Blattella germanica* (Jones *et al.*, 2021). La délétion de ce polypeptide dans le nAChR hybride Da2 de *Drosophila melanogaster*/ β 2 de poulet a conduit à une diminution de sensibilité du récepteur pour l'insecticide imidaclopride (IMI) suggérant son rôle dans l'interaction IMI-nAChRs d'insectes (Shimomura *et al.*, 2004). Enfin, la boucle intracellulaire qui relie le TM3 et le TM4 des sous-unités Agama3 et Da3 est inhabituellement longue (Schulz *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2005).

Le regroupement des gènes des sous-unités nicotiniques d'insectes en cluster a pu être observé pour plusieurs espèces. Par exemple, les sous-unités Da1, Da2 et D β 2 de *Drosophila melanogaster* sont espacées de 200 kilobases (kb) (Jones *et al.*, 2005) ; Agama1, Agama2 et Agama8 d'*Anopheles gambiae* de 220kb (Jones *et*

al., 2005) ; Amela1 et Amela2 d'*Apis mellifera* de 120kb (Jones *et al.*, 2006) ; Bgera1, Bgera2 et Bgera8 de *Blatella germanica* de 686kb (Jones *et al.*, 2021). Les sous-unités $\alpha 7$ et $\beta 1$ sont également regroupées en cluster chez *Tribolium castaneum*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera*, *Blatella germanica* et *Periplaneta americana* (Jones *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2006; Jones et Sattelle, 2007; Jones *et al.*, 2021). Des expériences d'immunohistochimie et de co-immunoprécipitation ont pu démontrer que les sous-unités Da1, Da2 et D $\beta 2$ composent certains sous-types de nAChRs (Chamaon *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent que le regroupement des gènes des sous-unités nicotiniques en cluster faciliterait la coordination de leur expression et leur assemblage pour former un nAChR fonctionnel.

Groupe Espèce	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$ - $\alpha 7$	$\beta 1$	$\alpha 8/\beta 2$	Réf
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Apisuma1	Apisuma2	Apisuma3	Apisuma4	Apisuma6 Apisuma7	Apisum $\beta 1$	Apisuma8	Dale <i>et al.</i> , 2010
<i>Aedes aegypti</i>	Aaea1	Aaea2	Aaea3	Aaea4	Aaea5 Aaea6 Aaea7	Aae $\beta 1$	Aaea8	Lan <i>et al.</i> , 2021
<i>Anopheles gambiae</i> (Ag)	Agama1	Agama2	Agama3	Agama4	Agama5 Agama6 Agama7	Agam $\beta 1$	Agama8	Jones <i>et al.</i> , 2005
<i>Apis mellifera</i> (Am)	Amela1	Amela2	Amela3	Amela4	Amela5 Amela6 Amela7	Amel $\beta 1$	Amela8	Jones <i>et al.</i> , 2006
<i>Blatella germanica</i>	Bgera1	Bgera2	Bgera3	Bgera4	Bgera5 Bgera6 Bgera7	Bger $\beta 1$	Bgera8	Jones <i>et al.</i> , 2021
<i>Bombyx mori</i> (Bmor)	Bma1	Bma2	Bma3	Bma4	Bma5 Bma6 Bma7	Bm $\beta 1$	Bma8	Shao <i>et al.</i> , 2007
<i>Drosophila melanogaster</i> (Dm ; Dmel)	Da1 (ALS)	Da2 (SAD)	Da3	Da4	Da5 Da6 Da7	D $\beta 1$ (ARD)	D $\beta 2$ (SDB)	Littleton et Ganetzky, 2000
<i>Locusta migratoria</i>	Loca1	Loca2	Loca3	Loca4	Loca5 Loca6 Loca7	Loc $\beta 1$	Loca8	Wang <i>et al.</i> , 2015
<i>Periplaneta americana</i>	Pamea1	Pamea2	Pamea3	Pamea4	Pamea5 Pamea6 Pamea7	Pame $\beta 1$	Pamea8	Taillebois et Thany, 2016; Jones <i>et al.</i> , 2021
<i>Tribolium castaneum</i>	Tcasa1	Tcasa2	Tcasa3	Tcasa4	Tcasa5 Tcasa6 Tcasa7	Tcas $\beta 1$	Tcasa8 Tcasa11	Jones et Sattelle, 2007

Tableau 1 : Les sous-unités nicotiniques conservées chez les insectes. Tableau non-exhaustif des sous-unités nicotiniques hautement conservées chez différentes espèces d'insectes. Il est indiqué entre parenthèses d'autres dénominations qui font références au même gène, ou à la même famille de gènes et qui peuvent être retrouvées dans la littérature.

2.3.2. Les sous-unités nicotiques divergentes

De façon générale, les séquences protéiques des sous-unités nicotiques équivalentes identifiées chez différentes espèces d'insectes ont un pourcentage d'identité d'au moins 60%. Cependant, d'autres sous-unités nicotiques phylogénétiquement éloignées des sous-unités conservées ont été identifiées chez certaines espèces d'insectes. Ces sous-unités dites « divergentes » présentent une faible homologie de séquence protéique avec les autres sous-unités nicotiques d'insectes, soit moins de 29% d'identité (Jones et Sattelle, 2010). Contrairement aux groupes de sous-unités conservées, il est difficile d'identifier des rapports analogiques entre ces sous-unités divergentes. Chaque espèce d'insecte présente un ensemble de sous-unités α et β divergentes qui lui est propre (tableau 2).

Sous-unité Espèce	α	β	Réf
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Apisuma9 Apisuma10	Apisum β 2	Dale <i>et al.</i> , 2010
<i>Aedes aegypti</i>	Aaea9	-	Lan <i>et al.</i> , 2021
<i>Anopheles gambiae</i> (Ag)	Agama9	-	Jones <i>et al.</i> , 2005
<i>Apis mellifera</i> (Am)	Amela9	Amel β 2	Jones <i>et al.</i> , 2006
<i>Blatella germanica</i>	Bgera9 Bgera10	Bger β 2 Bger β 3 Bger β 4 Bger β 5 Bger β 6 Bger β 7	Jones <i>et al.</i> , 2021
<i>Bombyx mori</i> (Bmor)	Bma9	Bm β 2 Bm β 3	Shao <i>et al.</i> , 2007
<i>Drosophila melanogaster</i> (Dm ; Dmel)	-	D β 3	Littleton et Ganetzky, 2000
<i>Locusta migratoria</i>	Loca9	Loc β 2 Loc β 3	Wang <i>et al.</i> , 2015 Bao <i>et al.</i> , 2017
<i>Periplaneta americana</i>	Pamea9	Pame β 2 Pame β 3 Pame β 4 Pame β 5 Pame β 6 Pame β 7 Pame β 8 Pame β 9 Pame β 10	Jones <i>et al.</i> , 2021
<i>Tribolium castaneum</i>	Tcasa9 Tcasa10	-	Jones et Sattelle, 2007

Tableau 2 : Les sous-unités divergentes chez les insectes. Tableau non-exhaustif des sous-unités nicotiques divergentes identifiées chez différentes espèces d'insectes. Il est indiqué entre parenthèses d'autres dénominations qui font référence à la même famille de gènes et qui peuvent être retrouvées dans la littérature.

Le nombre de sous-unités nicotiniques divergentes est variable selon les espèces. A ce jour, les blattes *Blatella germanica* et *Periplaneta americana* sont les insectes qui en présentent le plus, soit 8 et 10 respectivement. Certains de ces gènes forment des clusters. Par exemple, Bger α 10 et Bger β 7 sont espacés de 63kb ; Bger β 3, Bger β 4, Bger β 5 et Bger β 6 de 50kb ; Pame β 7 et Pame β 9 de 53kb ; Pame β 3, Pame β 4, Pame β 5, Pame β 6 et Pame β 8 de 50kb (Jones *et al.*, 2021). Ce regroupement en cluster pourrait impliquer des évènements de duplication de gènes récents expliquant le nombre conséquent de sous-unités divergentes au sein de ces espèces. Les sous-unités divergentes ont également la particularité d'avoir une boucle intracellulaire qui relie les TM3 et TM4 plus courte. De plus, Tcasa9, Bma9, Bm β 2, Bm β 3 ainsi que toutes les sous-unités divergentes de *Blatella germanica* et *Periplaneta americana* à l'exception de leur sous-unité α 9 ne présentent pas le motif très conservé GEK (Gly-Glu-Lys) qui précède le TM2 (Jones et Sattelle, 2007; Shao *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2021). Ce motif est important dans la sélectivité ionique du canal, notamment le résidu Glu qui participe à la formation de l'anneau intermédiaire décrit précédemment (Jensen *et al.*, 2005). Des études de mutagénèse dirigée sur le nAChR homomérique α 7 de poulet ont montré que la délétion de ce motif altérerait la perméabilité calcique du récepteur (Bertrand *et al.*, 1993). Ainsi, ces sous-unités divergentes d'insectes pourraient participer à la formation de nAChRs avec un canal qui présente des caractéristiques particulières. Les sous-unités Tcasa9 et Bger α 10 présentent un motif inhabituel FXCC (Phe-X-Cys-Cys) à la place du motif conservé YXCC (Tyr-X-Cys-Cys), qui est impliqué dans la fixation des insecticides néonicotinoïdes (Shimomura *et al.*, 2004), ce qui pourrait impliquer des propriétés particulières de leurs sites de fixation (Jones et Sattelle, 2007; Jones *et al.*, 2021). Les sous-unités Apisuma9 et Apisuma10 ne présentent pas le deuxième résidu Cys qui permet de former la boucle cystéine caractéristique des CysLGIC (Dale *et al.*, 2010). Cette boucle est impliquée dans l'assemblage du récepteur (Green et Wanamaker, 1997). Des expériences de mutagénèse dirigée sur l'un des deux acides aminés qui participent à la formation de cette boucle dans la sous-unité α de la torpille *Torpedo californica* et l'expression fonctionnelle d'un nAChR avec ces sous-unités porteuses de la mutation en ovocyte de xénope ont démontré que la fixation de l' α -bgt sur le récepteur n'était plus possible et que la réponse à l'ACh était altérée (Sumikawa et Gehle, 1992). Ainsi, les sous-unités Apisuma9 et Apisuma10 auraient des propriétés fonctionnelles et pharmacologiques différentes.

La fonction des sous-unités nicotiniques divergentes ainsi que l'implication de leur spécificité pour une espèce d'insecte donnée sont encore largement inconnues. Cependant, il a été rapporté que la sous-unité nicotinique Loc β 3 participait à la formation d'un site de fixation de haute affinité pour l'IMI (Bao *et al.*, 2017). Les sous-unités divergentes pourraient alors être impliquées dans des sous-types de nAChRs spécifiques d'une espèce d'insecte qui sont des cibles privilégiées d'insecticides.

2.3.3. Les modifications post-transcriptionnelles responsables de la diversification des sous-unités nicotiniques chez les insectes

a) L'épissage alternatif

Le nombre de gènes codants pour les sous-unités nicotiniques d'insectes est généralement plus faible que pour les autres organismes. Bien que l'analyse récente des génomes des blattes *Blatella germanica* et *Periplaneta americana* a permis de démontrer qu'elles possèdent respectivement 17 et 19 gènes codants pour des sous-unités nicotiniques (Jones *et al.*, 2021), la majorité des insectes pour lesquels ces gènes ont été

identifiés n'en présente que jusqu'à 12 (Jones et Sattelle, 2010). En comparaison, l'Homme en possède 16 (Millar et Gotti, 2009) et le nématode *Caenorhabditis elegans*, 29 (Jones et al., 2007b). Cependant, des phénomènes d'épissage alternatif des sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ et $\alpha 8$ ont pu être décrits chez les insectes permettant ainsi de diversifier leur répertoire de sous-unités nicotiniques. Le nombre de variants produits diffère selon les espèces mais les exons épissés sont relativement conservés (tableau 3).

Sous-unité Espèce	$\alpha 4$ exon 4	$\alpha 6$ exon 3	$\alpha 6$ exon 8	$\alpha 7$ exon 7	$\alpha 7$ exon 8	$\alpha 8$ exon 7	Réf
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	2	1	2	2	3	1	Dale et al., 2010
<i>Anopheles gambiae</i>	2	2	2	1	1	1	Jones et al., 2005
<i>Apis mellifera</i>	2	1	2	1	1	1	Jones et al., 2006
<i>Blatella germanica</i>	2	2	3	2	4	1	Jones et al., 2021
<i>Bombyx mori</i>	2	2	2	1	1	2	Jin et al., 2007; Shao et al., 2007
<i>Drosophila melanogaster</i>	2	2	3	1	1	1	Lansdell et Millar, 2000; Grauso et al., 2002
<i>Periplaneta americana</i>	2	2	3	2	4	1	Jones et al., 2021
<i>Tribolium castaneum</i>	2	2	3	1	1	1	Jones et Sattelle, 2007

Tableau 3 : L'épissage alternatif des sous-unités nicotiniques chez les insectes. Tableau non-exhaustif du nombre de variants des sous-unités nicotiniques produits par épissage alternatif.

Les différents variants d'exons obtenus par épissage alternatif présentent des substitutions d'acides aminés au sein de régions importantes pour le fonctionnement et l'assemblage du récepteur. Les deux variants de l'exon 4 des sous-unités $\alpha 4$, nommés 4 et 4', présentent des résidus différents au niveau des boucles E et cystéine. Elles sont impliquées dans le site de fixation et l'assemblage du nAChR respectivement. Par exemple, des tests d'affinité de liaison des nAChRs hybrides D $\alpha 4^{\text{exon4}}$ / $\beta 2$ de rat et D $\alpha 4^{\text{exon4}'}$ / $\beta 2$ exprimés dans des cellules S2 de drosophile a permis de conclure que, sachant que l'affinité du radioligand pour ces récepteurs ainsi que les quantités protéiques des sous-unités sont les mêmes, l'assemblage des nAChRs constitués des sous-unités D $\alpha 4^{\text{exon4}'}$ est moins efficace (Lansdell et Millar, 2000). Au sein de l'exon 8c d'Agam $\alpha 6$, un acide aminé leucine retrouvé dans le TM2 a été substitué par un résidu valine (Jones et al., 2005). Cette leucine est conservée au sein des variants de cet exon dans d'autres espèces d'insectes (Jones et Sattelle, 2010). Des expériences de mutagenèse dirigée, permettant la substitution de la leucine équivalente de la sous-unité $\alpha 7$ de poulet par une

valine, ont démontré que cette mutation impacte le passage du nAChR vers un état désensibilisé et augmente l'affinité du récepteur pour l'ACh (Revah *et al.*, 1991). Ainsi, l'épissage alternatif pourrait générer des isoformes de sous-unités nicotiques avec des propriétés fonctionnelles particulières à certaines espèces d'insectes. A ce jour, le puceron *Acyrtosiphon pisum* et les blattes *Blattella germanica* et *Periplaneta americana* sont les seuls insectes à présenter plusieurs isoformes de leur sous-unité $\alpha 7$ produites par épissage alternatif. Les variants de l'exon 7 ont des résidus différents au niveau de la boucle C et du TM1, et les variants de l'exon 8 au niveau du TM2 (Dale *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2021).

Finalement, l'existence de sous-unités nicotiques tronquées a été rapportée pour différentes espèces d'insectes. Elles sont produites en raison de l'absence d'un exon ou par la présence d'un codon stop en amont. Le rôle de ces sous-unités tronquées est encore inconnu mais la majorité d'entre elles sont dépourvues de certaines boucles impliquées dans la fixation du ligand sur le récepteur. Ainsi, leur capacité à pouvoir interagir avec l'ACh reste encore à déterminer (Jones et Sattelle, 2010). La co-transfection d'un variant complet de la sous-unité $\alpha 7$ de souris avec un variant tronqué de cette dernière dans des cellules GH4C1 a montré que ce dernier agit comme un régulateur négatif dominant des nAChR homomériques $\alpha 7$ (Saragoza *et al.*, 2003). Par la suite, une sous-unité nicotique tronquée humaine nommée dupa7 a été étudiée. Cette sous-unité tronquée dupa7 présente la même fonction régulatrice (Araud *et al.*, 2011; Sinkus *et al.*, 2015).

b) L'édition d'ARN

L'édition d'ARN est un autre mécanisme impliqué dans la diversification protéique des sous-unités nicotiques d'insectes. Ce mécanisme modifie des nucléotides spécifiques d'un pré-ARNm et produit ainsi des transcrits avec une séquence nucléotidique qui ne correspond pas à l'ADN génomique. Chez les insectes, cette édition peut être de plusieurs types mais le plus commun est la désamination d'une adénosine par une adénosine désaminase ou « ADAR » (« Adenosine Deaminase Acting on RNA ») pour former une inosine (Grau-Bové et Weetman, 2020). Lors de la traduction, l'inosine est interprétée comme étant une guanosine par la machinerie cellulaire et des acides aminés différents peuvent alors être incorporés à la chaîne peptidique en formation pouvant ainsi aboutir à de nouvelles isoformes de la protéine (Nishikura, 2010). Ces phénomènes d'édition d'ARN sont fréquemment observés pour les gènes impliqués dans la signalisation neuronale (Hoopengardner *et al.*, 2003). De telles modifications ont pu être rapportées pour les sous-unités $\alpha 6$ de la mouche *Drosophila melanogaster*, du scarabée *Tribolium castaneum*, de l'abeille *Apis mellifera*, du papillon *Bombyx mori* et de la blatte *Periplaneta americana* (Grauso *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2006; Jones et Sattelle, 2007; Shao *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2021) et semblent relativement conservées. Ces éditions des transcrits engendreraient la perte d'un site de N-glycosylation de la boucle E. Sachant que ces sites de N-glycosylation sont impliqués dans la maturation du récepteur ainsi que dans sa désensibilisation et la conductance du canal (Gehle *et al.*, 1997; Nishizaki, 2003), l'édition d'ARN pourrait altérer les propriétés des nAChRs. En dehors de ces sites d'édition conservés des sous-unités $\alpha 6$ d'insecte, d'autres sites, dont le nombre est variable selon les espèces d'insectes, ont été identifiés. A ce jour, la drosophile est l'insecte présentant le plus de sous-unités nicotiques avec des sites d'édition (Da5, Da6, Da7, D β 1 et D β 2) qui induisent des modifications de la séquence protéique au niveau de diverses régions fonctionnelles. L'édition d'ARN pourrait alors permettre de

créer des isoformes de sous-unités nicotiques spécifiques à une espèce d'insecte, isoformes qui pourraient être impliquées dans la formation de nAChRs particuliers (Jones et Sattelle, 2010).

2.4. Pharmacologie générale des récepteurs nicotiques d'insectes

2.4.1. Profils pharmacologiques des récepteurs nicotiques natifs d'insectes

L'identification et la caractérisation pharmacologique de certains sous-types de nAChRs natifs d'insectes ont été possibles, notamment par des approches électrophysiologiques, à partir de préparations neuronales issues de différentes espèces d'insectes. Les nAChRs d'insectes, à l'instar des nAChRs de vertébrés, sont regroupés en deux classes pharmacologiques qui se distinguent par leur sensibilité à l' α -bungarotoxine (α -bgt). Parmi ceux-ci, des sous-types de nAChRs natifs ont pu être étudiés au sein de neurones « Dorsal Unpaired Median » (neurones DUM) contenus dans le dernier ganglion abdominal (DGA) de la blatte *Periplaneta americana* adulte. Entre autres, deux sous-types de nAChRs insensibles à l' α -bgt ont pu être caractérisés pharmacologiquement par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière (Courjaret et Lapied, 2001). La mesure des courants ioniques induits par l'application d'agonistes cholinergiques (ACh et NIC) en potentiel imposé combinée à l'application de différents antagonistes a permis d'identifier ces sous-types de récepteurs insensibles à l' α -bgt. En effet, les courbes courant-potentiel biphasiques ainsi obtenues mettent en évidence que les courants mesurés pour des valeurs de potentiels allant de -90 à -30mV correspondent préférentiellement à l'activation d'une première population de nAChRs, nommée nAChR1, et les courants mesurés pour des valeurs de potentiels allant de -30 à +20mV correspondent quant à eux à l'activation d'une deuxième population de récepteurs, nAChR2. Le nAChR2 présente un fonctionnement atypique. Quand le récepteur est à l'état de repos, son canal est ouvert et lorsqu'un agoniste se fixe, il se ferme (Courjaret et Lapied, 2001; Thany *et al.*, 2008). Les profils pharmacologiques sont présentés dans le tableau 4. Il est intéressant de noter que seul le nAChR1 est sensible à l'IMI. Plus tard, il a été démontré que les nAChR1 et nAChR2 sont sensibles à d'autres molécules insecticides comme la clothianidine (CLO), l'acétamipride (ACET) et le sulfoxaflor (Thany, 2009; Bodereau-Dubois *et al.*, 2012; Houchat *et al.*, 2019). De manière intéressante, l'IMI inhibe de façon réversible le courant induit par l'application de sulfoxaflor (Houchat *et al.*, 2019) suggérant une complexité pharmacologique plus importante des nAChR1 et nAChR2 que celle décrite dans la littérature actuellement. De plus, Huahua Sun et ses collaborateurs se sont basés sur ces données électrophysiologiques et pharmacologiques des nAChR1 et nAChR2 pour élucider leur composition en sous-unités nicotiques (Sun *et al.*, 2017). Ainsi, en combinant l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre les sous-unités nicotiques de la blatte à la mesure des courants ioniques induits par l'application de NIC tout en imposant un potentiel adéquat pour étudier préférentiellement les nAChR1 ou les nAChR2, les auteurs ont déterminé les sous-unités nicotiques pouvant composer ces récepteurs. Ainsi, les nAChR1 peuvent être composés des sous-unités nicotiques Pamea3, Pamea8 et Pame β 1 et les nAChR2 des sous-unités Pamea1, Pamea2 et Pame β 1. En revanche, comme de nouvelles sous-unités nicotiques ont été identifiées au sein du génome de la blatte *Periplaneta americana* (Jones *et al.*, 2021), il est possible que d'autres sous-unités nicotiques participent à la formation de ces sous-types de récepteurs insensibles à l' α -bgt. En comparaison, la composition de deux sous-types de nAChRs de la cicadelle brune *Nilaparvata lugens* a pu être élucidée par co-immunoprécipitation. Le premier peut être composé des sous-unités nicotiques Nla3, Nla8 et NI β 1, et le deuxième de Nla1, Nla2 et

NIβ1 (Li *et al.*, 2010). De plus, des expériences d'immunoprécipitation couplées à des tests d'affinité de liaison avec de l'IMI radiomarquée montrent que le premier sous-type participe à la formation d'un site de haute affinité pour l'IMI et le deuxième, à un site de basse affinité (Li *et al.*, 2010).

Sous-type	nAChR1	nAChR2
Type de ligand		
Agoniste	NIC ACh CLO ACET Sulfoxaflor IMI	NIC ACh CLO ACET Sulfoxaflor
Antagoniste	d-tubocurarine	Mécamylamine α-conotoxine

Tableau 4 : Profils pharmacologiques des nAChR1 et nAChR2 des neurones DUM du DGA de la blatte *Periplaneta americana* adulte. ACET = acétamipride ; ACh = acetylcholine ; CLO = clothianidine ; IMI : imidaclopride ; NIC : nicotine. Basé sur Courjaret et Lapied, 2001; Thany, 2009; Bodereau-Dubois *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2017; Houchat *et al.*, 2019.

Au sein des neurones DUM contenus dans le DGA de la blatte adulte, d'autres sous-types de nAChRs ont pu être caractérisés. Des nAChRs sensibles à l'α-bgt ainsi qu'à des antagonistes nicotiques et muscariniques ont notamment pu être identifiés (Lapied *et al.*, 1990; Grolleau *et al.*, 1996). Cependant, à ce jour, aucune étude complémentaire ne permet d'affirmer que cette mixité pharmacologique se traduit par une mixité fonctionnelle des récepteurs. Enfin, des études électrophysiologiques réalisées sur ce modèle cellulaire ont aussi révélé l'existence de nAChRs à la fois sensibles à l'α-bgt et à certains néonicotinoïdes (Thany, 2009; Sun *et al.*, 2017).

Hormis les études réalisées sur les neurones DUM issus du DGA, d'autres travaux ont mis en évidence des sous-types de nAChRs dans des préparations neuronales différentes issues de la blatte *Periplaneta americana* adulte. Par exemple, Vincent Salgado et ses collaborateurs (Salgado et Saar, 2004; Salgado, 2016; Salgado, 2021) ont pu identifier au sein de neurones contenus dans les ganglions thoraciques de la blatte, qu'ils pensent être des motoneurones, des neurones DUM et des interneurones, deux autres sous-types de nAChRs qui sont sensibles à l'α-bgt. Le premier, nommé nAChRD pour « Desensitizing nAChR », peut être dans un état désensibilisé lorsqu'un agoniste est appliqué en continu. Le deuxième, nAChRN pour « Non-desensitizing nAChR » ne se désensibilise pas et est activé en continu par des agonistes cholinergiques. Les auteurs ont pu élucider les profils pharmacologiques de ces sous-types de nAChRs (tableau 5). Il est intéressant de noter que les nAChRD présentent une affinité plus importante pour l'IMI que les nAChRN. Les nAChRD et nAChRN sont sensibles à l'IMI à une concentration de l'ordre du nanomolaire et micromolaire respectivement. Comme les symptômes excitateurs induits par un traitement avec l'IMI ne sont observés que lorsque la concentration de cet insecticide est de l'ordre du micromolaire dans l'hémolymphe des insectes (Greenwood *et al.*, 2002) et qu'à

cette concentration les nAChRD sont désensibilisés, les auteurs ont suggéré que les nAChRN pourraient être impliqués dans l'effet insecticide de l'IMI.

Sous-type Type de ligand	nAChRD	nAChRN
Agoniste	NIC ACh Epibatidine CLO THIAM N-Desmethyl-thiamethoxame IMI N-Methylimidacloprid Sulfoxaflor Dinotefurane	NIC ACh Epibatidine CLO IMI
Antagoniste	α -bgt Condelphine Dh β E d-tubocurarine Mécamylamine MLA Phencyclidine Triflumezopyrim	α -bgt Condelphine Dh β E d-tubocurarine Mécamylamine MLA Phencyclidine Triflumezopyrim

Tableau 5 : Profils pharmacologiques des nAChRD et nAChRN des neurones issus des ganglions thoraciques de la blatte *Periplaneta americana* adulte. α -bgt = α -bungarotoxine ; ACh = acétylcholine ; CLO = clothianidine ; Dh β E : dihydro- β -érythroidine ; IMI = imidaclopride ; MLA = méthyllycaconitine ; NIC = nicotine ; THIAM = thiaméthoxame. Basé sur Nauen *et al.*, 2003; Salgado et Saar, 2004; Salgado, 2016; Salgado, 2021.

Finalement, on peut noter qu'un certain nombre d'études s'est intéressé à élucider les profils pharmacologiques des nAChRs natifs retrouvés dans plusieurs types cellulaires et ce à différents stades de développement chez d'autres espèces d'insectes (tableau 6). Entre autres, les nAChRs des neurones des lobes antennaires et des cellules de Kenyon des corps pédonculés de l'abeille *Apis mellifera* adulte présentent des profils pharmacologiques similaires. Cependant, les neurones des lobes antennaires présentent une sensibilité plus importante que les cellules de Kenyon des corps pédonculés pour la méthyllycaconitine (MLA ; CI₅₀ : 1,4±0,11nM vs 51,4±5,2nM) et le Dihydro- β -érythroidine (Dh β E ; CI₅₀ : 3,59±0,43nM vs 256±1,4nM) (Barbara *et al.*, 2008; Dupuis *et al.*, 2011). De plus, des expériences de RT-PCR sur cellule unique ont permis d'identifier les profils d'expression des sous-unités nicotiques au sein de ces types cellulaires. Les sous-unités nicotiques Amela2, Amela7, Amela8 et Amel β 1 sont exprimées dans les neurones des lobes antennaires et Amela2, Amela8 et Amel β 1 dans les cellules de Kenyon (Dupuis *et al.*, 2011). Ainsi, des différences dans la composition des nAChRs de ces deux types cellulaires pourraient expliquer les variations de sensibilité à ces antagonistes.

Espèce	Type cellulaire	Agoniste	Antagoniste	Réf
<i>Apis mellifera</i> (pupe)	Neurone des lobes antennaires	ACh NIC Epibatidine IMI	α -bgt Dh β E MLA Picrotoxine	Barbara <i>et al.</i> , 2005
	Cellule de Kenyon	ACh NIC Epibatidine Carbamylcholine IMI	α -bgt Dh β E MLA Mécamylamine Hexamethonium d-tubocurarine	Goldberg <i>et al.</i> , 1999; Déglise <i>et al.</i> , 2002; Wüstenberg et Grünewald, 2004
<i>Apis mellifera</i> (adulte)	Neurone des lobes antennaires	ACh NIC IMI	α -bgt Dh β E MLA	Barbara <i>et al.</i> , 2008
	Cellule de Kenyon	ACh NIC IMI	α -bgt Dh β E MLA	Dupuis <i>et al.</i> , 2011
<i>Drosophila melanogaster</i> (larve)	Neurone impliqué dans le contrôle des rythmes biologiques	ACh NIC	Mécamylamine	Wegener <i>et al.</i> , 2004
	Motoneurone	ACh	d-tubocurarine	Rohrbough et Broadie, 2002
	Neurone cholinergique	ACh IMI	α -bgt Mécamylamine	Jepson <i>et al.</i> , 2006
<i>Drosophila melanogaster</i> (pupe)	Cellule de Kenyon	ACh	α -bgt Curare	Su et O'Dowd, 2003
<i>Heliothis virescens</i>	Neurone de la chaîne nerveuse ventrale	IMI CLO N-desméthyl-thiaméthoxame	-	Nauen <i>et al.</i> , 2003

Tableau 6 : Liste non-exhaustive de profils pharmacologiques de nAChRs natifs présents dans différents types cellulaires d'insectes. Le symbole «-» ne signifie pas que les nAChRs natifs ne sont sensibles à aucun antagoniste mais, qu'à ma connaissance, aucune étude n'a rapporté l'effet de telles molécules sur ces préparations neuronales. α -bgt = α -bungarotoxine ; ACh = acétylcholine ; CLO = clothianidine ; Dh β E = dihydro- β -érythroïdine ; IMI = imidaclopride ; MLA = méthyllycaconitine ; NIC = nicotine.

2.4.2. Influence de la composition en sous-unités nicotiques sur la pharmacologie des récepteurs nicotiques d'insectes

Bien que les sous-unités nicotiques pouvant participer à la formation de sous-types de nAChRs natifs ont pu être déterminées pour diverses espèces d'insectes (Li *et al.*, 2010; Dupuis *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2017) et qu'altérer leur expression impacte leur sensibilité aux insecticides à l'échelle de la cellule (Sun *et al.*, 2017) ou de l'organisme (Zhang *et al.*, 2015b; Qu *et al.*, 2016; Perry *et al.*, 2021; Bantz *et al.*, 2022), il est aujourd'hui encore impossible de déterminer la composition précise en sous-unités nicotiques d'un récepteur natif et d'y associer un profil pharmacologique. Pour pallier ces limitations, l'expression en système hétérologue de nAChRs fonctionnels d'insectes recombinés, hybrides ou chimériques permet, entre autres, de pouvoir caractériser pharmacologiquement, par des tests électrophysiologiques ou d'affinité de liaison, un nAChR dont la composition en sous-unités nicotiques est connue. L'expression en système hétérologue de nAChRs hybrides qui sont composés de sous-unités nicotiques d'insectes et de vertébrés ou de nAChRs composés de sous-unités chimériques qui présentent des domaines issus d'autres récepteurs transmembranaires a permis de contourner les difficultés rencontrées dans l'expression fonctionnelle de nAChRs recombinés qui eux sont uniquement composés de sous-unités d'insectes (Millar et Lansdell, 2010). Cependant, dans ce cas, il peut s'avérer difficile de suggérer des profils pharmacologiques propres aux nAChRs d'insectes. En ce sens, la co-transfection de sous-unités nicotiques d'insectes avec des protéines chaperonnes a permis d'augmenter l'efficacité de l'expression en système hétérologue des nAChRs d'insectes recombinés qui s'avérait hasardeuse (Millar et Lansdell, 2010). Ainsi, des nAChRs homopentamériques recombinés ont pu être exprimés et leur réponse à différents agonistes cholinergiques a pu être évaluée (tableau 7). Les nAChRs homomériques de vertébrés, qui ne peuvent être composés uniquement des sous-unités $\alpha 7$ ou $\alpha 9$, sont sensibles à l' α -bgt (Gotti et Clementi, 2004). Ainsi, il est couramment admis que les nAChRs homomériques sont sensibles à cette toxine. Malgré l'absence de liaison de l' α -bgt radiomarquée aux nAChRs homomériques Da5 et Da7 exprimés en cellules S2 de drosophile qui pourrait être liée à un problème de repliement ou d'adressage des protéines, les courants mesurés par l'application d'ACh par la technique de double microélectrode intracellulaire sont complètement inhibés et ceux de manière réversible par l' α -bgt lorsque que ces récepteurs sont exprimés en ovocyte de xénope (Lansdell *et al.*, 2012). De plus, selon la même technique, la réponse à l'ACh des nAChRs homomériques Mpa1 et Amela6 est inhibée par l' α -bgt de manière irréversible (Sgard *et al.*, 1998) et réversible (Hawkins *et al.*, 2022) respectivement. En revanche, les nAChRs Mpa2 et Pamea7 y sont insensibles (Sgard *et al.*, 1998; Cartereau *et al.*, 2020). Ainsi, au vu des données pharmacologiques disponibles, il peut être suggéré que, contrairement aux nAChRs homomériques de vertébrés, les nAChRs homomériques d'insectes peuvent être sensibles ou insensibles à l' α -bgt. On peut également noter que le nAChR Amela6 a une affinité plus importante pour l'ACh et que le nAChR Mpa2 a une affinité plus importante pour la NIC. De plus, le nAChR homomérique Amela5 a un profil pharmacologique particulier. Il présente une faible affinité pour l'ACh (tableau 7) et possède une plus grande affinité pour la sérotonine ($CE_{50} = 119\mu M$) que pour l'ACh ($CE_{50} = 2,336mM$; Mitchell *et al.*, 2022).

Espèce	nAChR	ACh		NIC		Réf
		CE ₅₀	I _{max}	CE ₅₀	I _{max}	
<i>Drosophila melanogaster</i>	Da5 (sensible à l'α-bgt)	8,8μM	200nA			Lansdell et al., 2012
	Da7 (sensible à l'α-bgt)	6,7μM	86nA			Lansdell et al., 2012
<i>Myzus persicae</i>	Mpa1 (sensible à l'α-bgt)	40μM	20nA	0,5μM	40nA	Sgard et al., 1998
	Mpa2 (insensible à l'α-bgt)	nc	10nA	nc	10nA	Sgard et al., 1998
<i>Periplaneta americana</i>	Pamea7 (insensible à l'α-bgt)	nd	56nA	790μM	212nA	Cartereau et al., 2020
<i>Apis mellifera</i>	Amela5	2,366mM	nc	nc	nc	Mitchell et al., 2022
	Amela6 (sensible à l'α-bgt)	0,88μM	15nA			Hawkins et al., 2022

Tableau 7 : Tableau non-exhaustif représentant les réponses à l'ACh et NIC de divers nAChRs homopentamériques d'insectes exprimés en ovocyte de xénope. Les résultats ont été obtenus par la technique de double microélectrodes intracellulaires en imposant un potentiel. ACh = Acétylcholine ; CE₅₀ = Concentration d'agoniste induisant 50% de l'effet maximal ; I_{max} = Amplitude maximale du courant ionique ; nc = Non-communicé ; nd = Non-déterminé ; NIC = Nicotine.

L'expression fonctionnelle en système hétérologue de nAChRs hétéropentamériques d'insectes recombinés a été rapportée entre autres pour la mouche *Drosophila melanogaster* (Lansdell et al., 2012; Ihara et al., 2020; Komori et al., 2023), l'abeille *Apis mellifera* et le bourdon *Bombus terrestris* (Ihara et al., 2020). Des profils de réponses à l'IMI, la CLO et le thiaclopride (THI) ont pu être établis pour différents nAChRs hétéromériques formés par la combinaison des sous-unités Da1, Da2, Da3, Da4, Dβ1, Dβ2 ou Dβ3 de *Drosophila melanogaster* (tableau 8). Dans ce cas, les trois insecticides présentent un effet agoniste (Ihara et al., 2020; Komori et al., 2023). Les auteurs ont déterminé que substituer les sous-unités Da1 ou Da2 par Da3 augmentait l'affinité du récepteur pour l'IMI et la CLO et que remplacer Da2 par Da3 augmentait l'affinité du nAChR pour le THI. Ainsi, Da2 diminuerait l'affinité du récepteur pour les néonicotinoïdes alors que Da3 pourrait l'augmenter (Komori et al., 2023). De plus, il a pu être démontré par des tests locomoteurs que diminuer l'expression de la sous-unité Da2 de la drosophile adulte par la technique d'interférence ARN (ARNi) augmente la toxicité de l'IMI, la CLO et le THI favorisant l'hypothèse que Da2 agit comme un régulateur négatif de l'affinité des récepteurs pour ces insecticides (Komori et al., 2023). Enfin, sachant que protéger les organismes non-cibles, comme les insectes pollinisateurs, est une priorité dans la lutte contre les insectes ravageurs et notamment dans la mise en place de nouvelles réglementations de l'utilisation des insecticides, l'expression en système hétérologue de nAChRs permet d'évaluer leur sensibilité à de tels composés et de les comparer avec celles d'autres espèces d'insectes. En ce sens, l'affinité des nAChRs hétéromériques composés des sous-unités

$\alpha 1$, $\alpha 8$, $\beta 1$ et $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 8$, $\beta 1$ de l'abeille *Apis mellifera* et du bourdon *Bombus terrestris* pour des néonicotinoïdes a été évaluée (tableau 8). Ces récepteurs présentent une affinité plus importante pour la CLO que la plupart des nAChRs de la drosophile décrits précédemment (Ihara *et al.*, 2020).

Espèce	nAChR recombiné	IMI		THI		CLO	
		pCE ₅₀	nI _{max}	pCE ₅₀	nI _{max}	pCE ₅₀	nI _{max}
<i>Drosophila melanogaster</i>	Da1/Dβ1	7,16 ± 0,15	0,122 ± 0,007	7,79 ± 0,21	0,091 ± 0,009	7,13 ± 0,10	0,508 ± 0,015
	Da3/Dβ1	8,32 ± 0,21	0,032 ± 0,003	7,80 ± 0,08	0,016 ± 0,001	7,54 ± 0,04	0,691 ± 0,013
	Da1/Da3/Dβ1	7,58 ± 0,23	0,170 ± 0,020	8,07 ± 0,20	0,047 ± 0,006	7,20 ± 0,09	0,627 ± 0,025
	Da1/Da2/Dβ1	6,71 ± 0,14	0,031 ± 0,002	6,92 ± 0,08	0,025 ± 0,001	5,07 ± 0,11	0,699 ± 0,034
	Da2/Da3/Dβ1	6,88 ± 0,29	0,101 ± 0,016	6,92 ± 0,19	0,045 ± 0,006	6,81 ± 0,08	0,882 ± 0,076
	Da1/Dβ1/Dβ2	6,99 ± 0,18	0,076 ± 0,006	7,86 ± 0,10	0,043 ± 0,002	6,64 ± 0,10	0,360 ± 0,016
	Da3/Dβ1/Dβ2	8,28 ± 0,09	0,039 ± 0,002	8,32 ± 0,21	0,022 ± 0,003	7,46 ± 0,08	0,492 ± 0,016
	Da1/Da2/Da3/Dβ1	7,08 ± 0,15	0,094 ± 0,007	7,73 ± 0,19	0,047 ± 0,004	6,55 ± 0,07	0,817 ± 0,024
	Da1/Da3/Dβ1/Dβ2	7,52 ± 0,12	0,330 ± 0,018	8,00 ± 0,25	0,107 ± 0,015	7,40 ± 0,07	0,684 ± 0,022
	Da1/Da2/Dβ1/Dβ2	6,45 ± 0,21	0,165 ± 0,016	7,10 ± 0,30	0,074 ± 0,014	6,31 ± 0,10	0,800 ± 0,033
	Da2/Da3/Dβ1/Dβ2	7,00 ± 0,29	0,125 ± 0,018	8,08 ± 0,33	0,017 ± 0,002	7,29 ± 0,07	0,634 ± 0,020
	Da1/Da2/Da3/Dβ1/Dβ2	6,47 ± 0,14	0,142 ± 0,011	7,18 ± 0,17	0,059 ± 0,006	6,59 ± 0,07	0,812 ± 0,019
	Da2/Da3/Da4/Dβ1/Dβ2	7,40 ± 0,20	0,027 ± 0,002	7,99 ± 0,20	0,018 ± 0,002	7,11 ± 0,12	0,912 ± 0,041
	Da2/Da3/Dβ1/Dβ2/Dβ3	7,75 ± 0,31	0,021 ± 0,003	8,31 ± 0,17	0,010 ± 0,001	7,46 ± 0,06	0,695 ± 0,014
	Da1/Da3/Da4/Dβ1/Dβ2	7,30 ± 0,17	0,101 ± 0,008	7,96 ± 0,10	0,026 ± 0,001	6,94 ± 0,06	0,425 ± 0,008
	Da1/Da3/Dβ1/Dβ2/Dβ3	7,72 ± 0,11	0,140 ± 0,008	8,63 ± 0,23	0,089 ± 0,009	7,60 ± 0,12	0,531 ± 0,026
Da1/Da2/Da4/Dβ1/Dβ2	6,48 ± 0,28	0,172 ± 0,020	7,01 ± 0,19	0,066 ± 0,007	6,72 ± 0,09	1,001 ± 0,031	
Da1/Da2/Dβ1/Dβ2/Dβ3	6,27 ± 0,21	0,080 ± 0,007	7,71 ± 0,43	0,023 ± 0,004	5,67 ± 0,11	0,974 ± 0,041	
<i>Apis mellifera</i>	Amela1/Amela8/Amelβ1	7,63 ± 0,13	0,075 ± 0,004	7,94 ± 0,19	0,058 ± 0,006	7,96 ± 0,07	0,788 ± 0,020
	Amela1/Amela2/Amela8/Amelβ1	7,48 ± 0,16	0,070 ± 0,005	8,16 ± 0,13	0,037 ± 0,003	8,09 ± 0,09	0,766 ± 0,024
<i>Bombus terrestris</i>	Btera1/Btera8/Bterβ1	7,60 ± 0,26	0,107 ± 0,010	7,29 ± 0,26	0,094 ± 0,008	7,87 ± 0,06	0,759 ± 0,018
	Btera1/Btera2/Btera8/Bterβ1	7,40 ± 0,20	0,085 ± 0,007	7,14 ± 0,38	0,092 ± 0,011	7,41 ± 0,10	0,680 ± 0,029

Tableau 8 : Tableau non-exhaustif représentant les combinaisons en sous-unités nicotiques des nAChRs hétéromériques de la mouche *Drosophila melanogaster*, de l'abeille *Apis mellifera* et du bourdon *Bombus terrestris* et leur réponse à différents insecticides néonicotinoïdes. pCE₅₀ = log[CE₅₀ (M)] et nI_{max} correspond à la valeur de l'amplitude maximale du courant ionique normalisée avec la réponse à l'ACh. Les pCE₅₀ en **vert** correspondent aux combinaisons de sous-unités qui présentent une affinité plus importante pour l'insecticide et les pCE₅₀ en **rouge** à celles qui présentent une plus faible affinité. CLO = clothianidine ; IMI = imidaclopride ; THI = thiaclopride. Basé sur Ihara *et al.*, 2020 ; Komori *et al.*, 2023.

Enfin, la stœchiométrie des sous-unités nicotiques qui composent les nAChRs d'insectes peut également influencer sur leur sensibilité à divers composés. Dans le cas du récepteur Da1/Dβ1 de *Drosophila melanogaster* exprimé en système hétérologue, l'injection d'ARNc à un ratio Da1:Dβ1 de 1:5 augmente l'affinité du récepteur pour l'IMI, suggérant que les sites orthostériques Da1/Dβ1 sont plus favorables à la fixation de l'IMI que les sites Da1/Da1 (Takayama *et al.*, 2022). De plus, il a également été démontré que modifier la stœchiométrie des sous-unités nicotiques des nAChRs hybrides Lda1 du doryphore *Leptinotarsa*

decemlineata/β2 de rat et de Lda1/Lda8/β2 de rat modulait l'affinité du récepteur pour l'ACh, l'IMI, la CLO, le thiaméthoxame (THIAM) et pour l'IMI, la CLO respectivement (Wang *et al.*, 2022).

Pour conclure, bien que les nAChRs recombinés soient fonctionnels, il est impossible de s'assurer que leur combinaison en sous-unités nicotiniques corresponde à celle d'un récepteur natif. De la même manière, il est possible que le nombre de nAChRs recombinés et exprimés à la membrane diffère par rapport aux neurones d'insectes. De plus, le choix du système hétérologue pour leur expression fonctionnelle (Lansdell *et al.*, 2012) et des protéines chaperonnes co-transfectées (Takayama *et al.*, 2022) peut impacter le niveau d'expression des nAChRs et leurs propriétés. Ainsi, les données obtenues par l'étude des récepteurs d'insectes recombinés en système hétérologue permettent d'obtenir des données pharmacologiques précieuses sur les nAChRs d'insectes mais il reste encore difficile d'extrapoler ces résultats aux récepteurs natifs.

2.5. Régulation des récepteurs nicotiniques d'insectes

2.5.1. Régulation par des modulateurs allostériques

La régulation des nAChRs peut faire appel à des facteurs externes au récepteur. Comme décrit précédemment, des études pharmacologiques ont permis de définir des molécules agonistes et des antagonistes compétitifs qui se lient aux sites orthostériques des nAChRs. Par la suite, il a pu être identifié des ligands qui sont capables de moduler la fonction des nAChRs en se liant à des sites dits allostériques qui sont distincts des sites orthostériques et qui peuvent se situer dans la partie transmembranaire du récepteur. Ces ligands sont nommés modulateurs allostériques. Ils peuvent être de trois types (Bertrand et Gopalakrishnan, 2007; Chatzidaki et Millar, 2015) :

- les modulateurs allostériques positifs (PAM) qui potentialisent l'effet d'un agoniste en augmentant l'amplitude du courant sans modifier la désensibilisation du récepteur (type I) ou en modulant ces deux paramètres (type II) ;
- les modulateurs allostériques négatifs (NAM) ou antagonistes non-compétitifs qui inhibent l'effet d'un agoniste ;
- les modulateurs allostériques silencieux (SAM) qui n'influencent pas l'effet d'un agoniste mais qui bloquent la fixation des PAM ou des NAM sur les sites allostériques.

Chez les insectes, des PAMs et des NAMs ont pu être caractérisés. Parmi les PAMs, on peut citer le spinosad, un insecticide de la famille des spinosynes. Il a pu être démontré chez la blatte *Periplaneta americana* que la spinosyne A, qui compose le spinosad avec la spinosyne D, potentialise l'effet de l'ACh sur les nAChRN décrits précédemment (figure 8 ; Salgado et Saar, 2004). Sur ce sous-type de récepteurs, la spinosyne A agirait comme un PAM de type I. Un effet similaire du spinetoram, le second insecticide membre de la famille des spinosynes, a également pu être rapporté sur ces sous-types de récepteurs (Salgado, 2021). De plus, des tests d'affinité de liaison avec des agonistes cholinergiques radiomarqués réalisés à partir de préparations neuronales issues de la chaîne nerveuse de la blatte *Periplaneta americana* ou de la tête de la mouche *Musca domestica* ont démontré que la spinosyne A se fixait sur un site distinct du site orthostérique (Orr *et al.*, 2009). Puis, l'étude de différentes toxines d'araignées a révélé qu'elles pouvaient également agir comme des PAMs (Windley *et al.*, 2017; Chambers *et al.*, 2019; Salgado, 2021). Par exemple, la ω-hexatoxin-Hv1a peut se fixer

sur un site allostérique et potentialiser la réponse à l'IMI, la CLO et le sulfoxaflor (Chambers *et al.*, 2019). De plus, la GS- ω / κ -hexatoxin-Hv1a, une toxine commercialisée pour son effet insecticide, se fixe sur le même site allostérique que la ω -hexatoxin-Hv1a et augmente l'effet de l'IMI (Chambers *et al.*, 2019). Il a également été démontré qu'elle agissait sélectivement sur les nAChRD de la blatte *Periplaneta americana* (Salgado, 2021). Enfin, quelques études ont présenté des NAMs agissant sur les nAChRs d'insectes. Par exemple, chez la mouche *Musca domestica*, le carvacrol, une molécule retrouvée dans certaines huiles essentielles et qui présente un effet insecticide, se fixe sur un site distinct du site orthostérique et inhibe la réponse à la NIC de manière non-compétitive (Tong *et al.*, 2013).

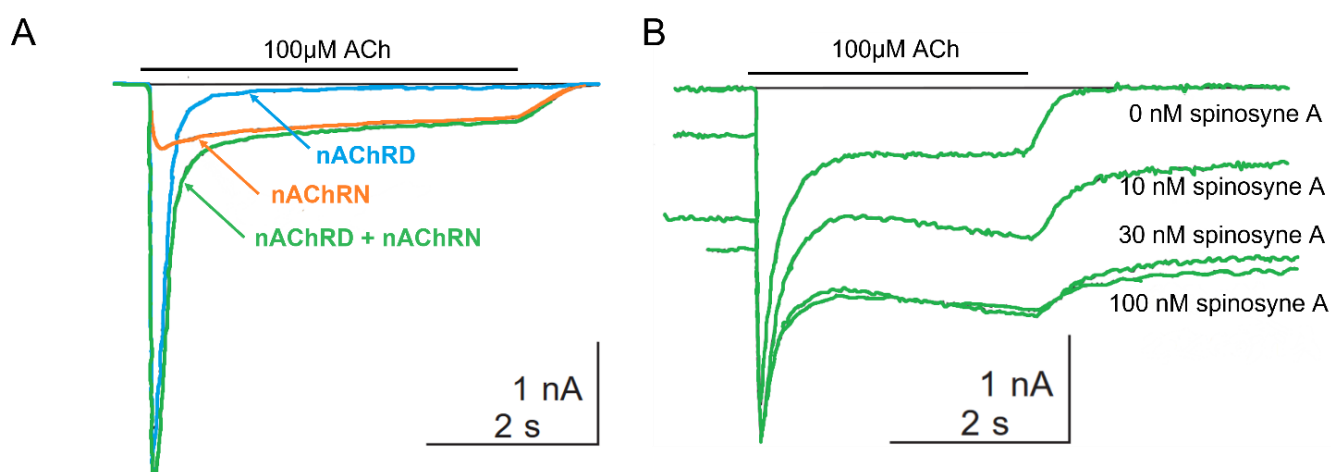


Figure 8 : Effet potentialisateur de la réponse à l'ACh de la spinosyne A sur les nAChRN de la blatte *Periplaneta americana*. (A) Représentation d'un courant ionique induit par l'application d'ACh mesuré sur un neurone issu des ganglions thoraciques de la blatte *Periplaneta americana* adulte. Les composantes qui correspondent préférentiellement aux nAChRD ou nAChRN ont pu être isolées par l'application d'IMI qui désensibilise les nAChRD à faible concentration ou de la MLA qui, appliquée à faible concentration, est supposée bloquer uniquement les nAChRN. (B) Représentation des courants ioniques induits par l'application d'ACh mesurés sur des neurones issus des ganglions thoraciques de la blatte et traités avec de la spinosyne A à différentes concentrations. L'application de spinosyne A augmente l'amplitude des courants ioniques correspondants préférentiellement aux nAChRN. Modifiée d'après Salgado et Saar, 2004.

2.5.2. Régulation par des protéines auxiliaires

La complexité de la fonction et des mécanismes de régulation des nAChRs ne peut être réellement appréhendée que par l'élucidation de son interactome. Chez les vertébrés, des protéines auxiliaires qui interagissent avec les nAChRs et qui sont impliquées dans la maturation, l'adressage ou encore dans la modulation de la fonction du récepteur ont pu être décrites (tableau 9 ; Jones *et al.*, 2010). Chez les insectes, les protéines chaperonnes RIC-3 (Lansdell *et al.*, 2012; Takayama *et al.*, 2022), NACHO (Hawkins *et al.*, 2022), UNC-50 (Takayama *et al.*, 2022) et TMX3 (Ihara *et al.*, 2020; Takayama *et al.*, 2022; Komori *et al.*, 2023) ont pu être identifiées et sont utilisées pour l'expression en système hétérologue de nAChRs fonctionnels. La combinaison de protéines chaperonnes co-transfectées peut impacter le fonctionnement du récepteur. Par exemple, la co-expression de RIC-3, UNC-50 et TMX3 avec le nAChR Da1/Dβ1 de la mouche *Drosophila*

melanogaster induit une amplitude de courant plus importante lors de l'application d'ACh comparée à celle du récepteur co-exprimé uniquement avec TMX3 (Takayama *et al.*, 2022). Enfin, les protéines auxiliaires Lynx1 et Lynx2 agissent comme des modulateurs des nAChRs. Les gènes qui codent pour ces protéines ont notamment pu être identifiés chez la cicadelle brune *Nilaparvata lugens* (Liu *et al.*, 2009). La co-expression de NI-Lynx1 avec les nAChRs hybrides Nla1/β2 de rat, Nla1/Nla2/β2, Nla3/Nla8/β2 et de NI-lynx2 avec Nla1/β2, Nla1/Nla2/β2 augmente l'amplitude de la réponse des récepteurs à l'IMI sans modifier leur sensibilité à cet insecticide (Liu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que des résultats similaires ont été rapportés pour les récepteurs mutés Nla1^{Y151S}/β2, Nla1^{Y151S}/Nla2/β2 et Nla3^{Y151S}/Nla8/β2 (Liu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010). Sachant que la mutation Y151S (Tyr151Ser) identifiée pour les sous-unités Nla1 et Nla3 d'une souche de cicadelle résistante à l'IMI est associée à la diminution de la réponse des nAChRs à cet insecticide et de la sensibilité du récepteur pour les néonicotinoïdes (Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006), les auteurs ont suggéré que NI-Lynx1 et NI-Lynx2 pourraient compenser, en partie, la diminution de la réponse à l'IMI observée chez cet insecte résistant.

Protéine auxiliaire	Localisation	Fonction	Réf
RIC-3 (Resistant to inhibitors of cholinesterase-3)	Réticulum endoplasmique (transmembranaire)	- Repliement du nAChR - Assemblage du nAChR - Adressage à la membrane	Halevi <i>et al.</i> , 2002 Millar, 2008 Dau <i>et al.</i> , 2013 Bao <i>et al.</i> , 2018
NACHO	Réticulum endoplasmique (transmembranaire)	- Repliement du nAChR - Assemblage du nAChR - Adressage à la membrane	Gu <i>et al.</i> , 2016 Matta <i>et al.</i> , 2017 Kweon <i>et al.</i> , 2020
UNC-50 (uncoordinated)	Appareil de Golgi (transmembranaire)	- Régulation de la biosynthèse des nAChRs - Adressage à la membrane	Eimer <i>et al.</i> , 2007
Lynx (Ly-6/neurotoxin)	Extracellulaire (Attaché à la membrane plasmique par une ancre GPI)	- Modulation de la réponse aux agonistes	Miwa <i>et al.</i> , 2006 Liu <i>et al.</i> , 2009 Yang <i>et al.</i> , 2010
TMX3 (transmembrane thioredoxin-related protein)	Réticulum endoplasmique (transmembranaire)	- Repliement du nAChR	Haugstetter <i>et al.</i> , 2005 Ihara <i>et al.</i> , 2020 Matsuda, 2021

Tableau 9 : Tableau non-exhaustif des protéines auxiliaires qui interagissent avec les nAChRs. Leur localisation ainsi que leurs fonctions sont également présentées. GPI = glycosylphosphatidylinositol.

2.5.3. Régulation des récepteurs nicotiques par les voies de signalisation intracellulaire : exemple des nAChR1 et nAChR2 de la blatte *Periplaneta americana*

L'analyse des séquences protéiques de diverses sous-unités nicotiques d'insecte a permis de décrire des sites de phosphorylation où des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation peuvent intervenir par l'intermédiaire de kinases et de phosphatases (Thany *et al.*, 2007; Raymond *et al.*, 2017). En effet, des acides aminés conservés associés à des sites de phosphorylation au sein de la boucle intracellulaire reliant le TM3 et le TM4 ont notamment pu être identifiés chez les moustiques *Aedes aegypti* (Lan *et al.*, 2021) et *Anopheles gambiae* (Jones *et al.*, 2005), l'abeille *Apis mellifera* (Jones *et al.*, 2006), le papillon *Bombyx mori* (Shao *et al.*, 2007), la mouche *Drosophila melanogaster* (Thany *et al.*, 2007), la blatte *Periplaneta americana* (Jones *et al.*, 2021) et le scarabée *Tribolium castaneum* (Jones et Sattelle, 2007). La phosphorylation de ces sites fait

intervenir des voies de signalisation intracellulaire impliquant notamment la protéine kinase dépendante de l'adénosine-monophosphate cyclique ou AMPc (PKA), les protéines kinases C de type 1 et 2 (PKC1 et PKC2), la protéine kinase dépendante du complexe Ca²⁺-calmoduline (CaMK) et la protéine kinase dépendante du guanosine-monophosphate ou GMPc (PKG ; figure 9). Dans cette partie, la régulation des nAChRs par les voies de signalisation intracellulaire est présentée en prenant pour exemple les nAChR1 et nAChR2 décrits chez la blatte *Periplaneta americana*.

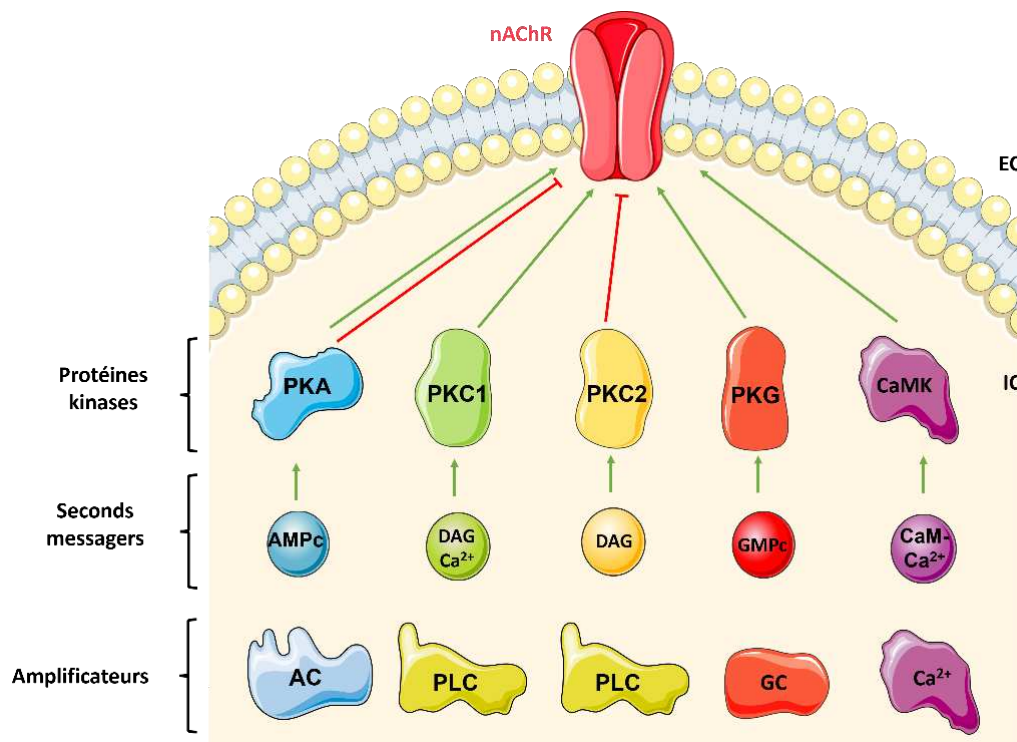


Figure 9 : Représentation des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la régulation des nAChRs d'insecte. Les flèches vertes et rouges représentent l'activation et l'inhibition du nAChR respectivement. AC = adénylate cyclase ; AMPc = adénosine-monophosphate cyclique ; CaM = calmoduline ; CaMK = protéine kinase dépendante du complexe Ca²⁺-calmoduline ; DAG = diacylglycérol ; EC = extracellulaire ; GC = guanylate cyclase ; GMPc = guanosine-monophosphate cyclique ; IC = intracellulaire ; nAChR = récepteur nicotinique ; PKA = protéine kinase dépendante de l'AMPc ; PKC1 = protéine kinase C 1 ; PKC2 = protéine kinase C 2 ; PKG = protéine kinase dépendante du GMPc ; PLC = phospholipase C. Basée sur Thany *et al.*, 2007.

a) Voie de signalisation intracellulaire impliquant les PKC1 et PKC2

Les PKCs sont principalement activées par le diacylglycérol (DAG) produit lors de l'hydrolyse du phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) par la phospholipase C (PLC). Les PKCs sont regroupées en 3 sous-familles : classique, nouvelle et atypique. Les PKCs classiques sont sensibles aux DAG et Ca²⁺, les nouvelles PKCs sont uniquement sensibles au DAG et les PKCs atypiques ne sont sensibles à aucun de ces composés (Gada et Logothetis, 2022). Il a été démontré que deux PKCs sont impliquées dans la régulation du nAChR1 des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* (Courjaret *et al.*, 2003). La PKC1, une PKC classique, régule positivement le nAChR1 alors que la PKC2, une nouvelle PKC, régule négativement ce sous-type de récepteur. Ces deux PKCs ainsi que leurs effets distincts ont pu être identifiés par la mesure des courants ioniques induits

par l'application de NIC associée à l'ester de phorbol phorbol-myristate acetate (PMA) ou au 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol (DiC8) qui activent préférentiellement la PKC1 et la PKC2 respectivement. De plus, l'activation de la PKC1 par le PMA est sensible aux variations de la concentration calcique intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$. En effet, l'augmentation modérée de la $[Ca^{2+}]_i$ est indispensable pour l'activation de la PKC1 par le PMA, alors que, à très forte concentration calcique, la PKC1 serait inhibée par la PP2B, une phosphatase dépendante du complexe calcium-calmoduline. Enfin, les auteurs ont également déterminé dans ces voies de signalisation une implication du récepteur à l'ACh de type muscarinique (mAChR) de type M1. Lorsqu'il est activé par des faibles concentrations de muscarine, il permet de moduler positivement les PKC1 et PKC2. En revanche, à forte concentration de muscarine, il va diminuer l'activité de la PKC1 et activer la PKC2 ce qui entraîne la régulation négative du nAChR1. Ainsi, les auteurs ont pu proposer, à partir de ces données, un schéma de régulation du nAChR1 par une voie de signalisation intracellulaire impliquant les PKC1 et PKC2 (figure 10).

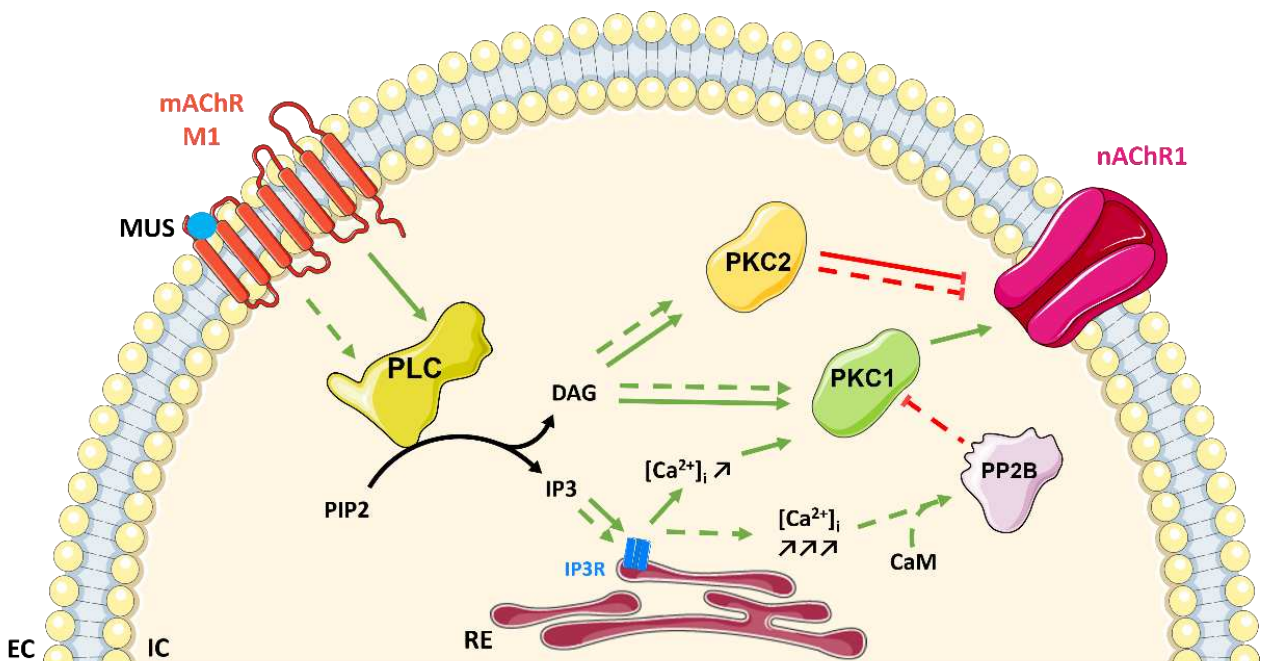


Figure 10 : Représentation schématique de la régulation du nAChR1 des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* par la voie de signalisation intracellulaire impliquant les PKC1 et PKC2 proposée par Courjaret *et al.*, 2003. Les flèches pleines et en pointillés représentent la signalisation intracellulaire induite par l'activation du mAChR de type M1 par une faible et une forte concentration de muscarine respectivement. Les flèches vertes représentent l'activation des différents éléments cellulaires et les flèches rouges, leur inhibition. $[Ca^{2+}]_i$ = concentration calcique intracellulaire ; CaM = calmoduline ; DAG = diacylglycérol ; EC = extracellulaire ; IC = intracellulaire ; IP3 = inositol-triphosphate ; IP3R = récepteur à l'inositol-triphosphate ; MUS = muscarine ; PIP2 = phosphatidylinositol-biphosphate ; PKC1 = protéine kinase C 1 ; PKC2 = protéine kinase C 2 ; PLC = phospholipase C ; PP2B = protéine phosphatase dépendante du complexe calcium-calmoduline de type 2B ; RE = réticulum endoplasmique.

b) Voies de signalisation intracellulaire impliquant la CaMK, la PKA et la PKG

Cinq isoformes de la protéine kinase dépendante du complexe Ca^{2+} -calmoduline de type II (CaMKII) ont pu être identifiées et clonées chez la blatte *Periplaneta americana* (Taillebois *et al.*, 2013). Des expériences de RT-PCR sur cellule unique ont démontré que seule l'isoforme CaMKII-E est exprimée au niveau des neurones DUM au sein desquels sont retrouvés les nAChR1 et nAChR2 (Taillebois *et al.*, 2013; List *et al.*, 2014). L'inhibition de l'expression de la CaMKII-E par des oligonucléotides antisens réduit les courants induits par l'application de NIC en présence ou non d' α -bgt suggérant l'implication de la CaMKII-E dans la régulation des nAChRs sensibles et insensibles à l' α -bgt des neurones DUM. De plus, cette inhibition de la CaMKII-E impacte l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire provoquée par l'activation des nAChRs par la NIC (List *et al.*, 2014). A partir de ces données et de la littérature, les auteurs ont suggéré un schéma de régulation des nAChRs sensibles et insensibles à l' α -bgt, qui regroupent les nAChR1 et nAChR2, impliquant la CaMKII-E et le Ca^{2+} (figure 11). Ces résultats et hypothèses peuvent être comparés aux travaux de Raphaël Courjaret et Bruno Lapied qui se sont intéressés à la régulation du nAChR1 par une voie de signalisation intracellulaire impliquant l'AMPC/PKA et la CaMKII (Courjaret et Lapied, 2001). En effet, la mesure des courants induits par l'application de NIC en présence de forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase (AC), à diverses concentrations a démontré que le nAChR1 est régulé par la voie de l'AMPC/PKA et que cette régulation est dépendante de la concentration en AMPC. En effet, à forte concentration, l'AMPC diminue l'amplitude du courant nicotinique. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de la calmoduline (CaM), le W7, bloque l'augmentation de l'amplitude de courant nicotinique observée en présence de forskoline démontrant l'implication de la CaM dans la régulation de la production d'AMPC par l'AC. Puis, la mesure des courants induits par l'application de NIC en présence de KN-62, un bloqueur de l'activation de la CaMKII par la CaM, et/ou d'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatase telle que la PP1/2A, a permis aux auteurs de suggérer que la CaMKII régule les nAChR1 de manière directe et indirecte *via* l'inhibition de phosphatases. Enfin, l'application de calmidazolium, un inhibiteur de CaM qui pourrait également inhiber une phosphodiesterase CaM-dépendante qui est impliquée dans le contrôle du niveau d'AMPC, réduit les courants observés par l'application de NIC sur les neurones DUM (Houchat *et al.*, 2022). Cette réduction n'est pas impactée par l'application d' α -bgt mais elle est plus importante en présence de d-tubocurarine et de mécamylamine qui sont des antagonistes des nAChR1 et nAChR2 respectivement. Ainsi, les auteurs ont suggéré que l'effet de la calmidazolium implique de manière indirecte des nAChRs insensibles à l' α -bgt, comme les nAChR1 et nAChR2, et que ce composé pourrait bloquer des phosphodiesterases conduisant à une augmentation du niveau d'AMPC qui activerait la PKA et régulerait négativement les nAChRs (Houchat *et al.*, 2022).

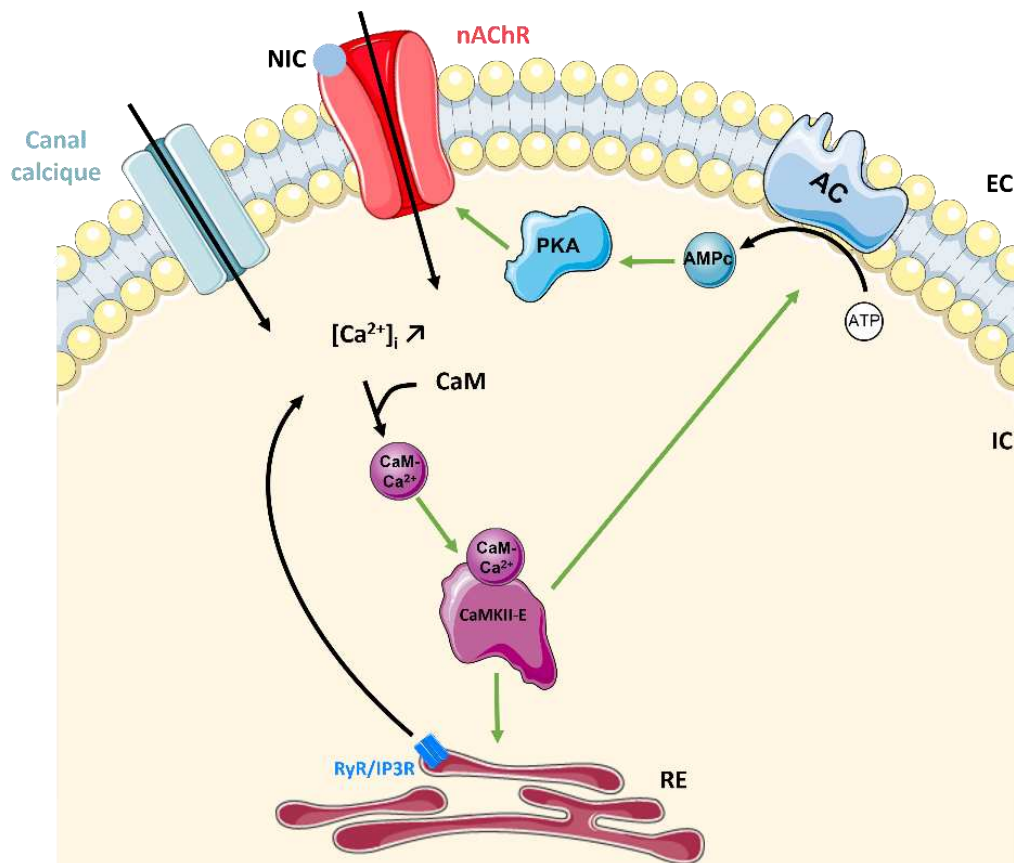


Figure 11 : Représentation schématique de la régulation des nAChRs sensibles et insensibles à l'α-bgt des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* impliquant le Ca²⁺ et la CaMKII-E ainsi que la voie AMPc/PKA proposée par List *et al.*, 2014. Les flèches vertes représentent l'activation des différents éléments cellulaires liée à une faible augmentation de l'AMPc. [Ca²⁺]_i = concentration calcique intracellulaire ; AC = adénylate cyclase ; AMPc = adénosine-monophosphate cyclique ; ATP = adénosine-triphosphate ; CaM = calmoduline ; Ca²⁺-CaM = complexe Ca²⁺-calmoduline ; CaMKII-E = isoforme E de la protéine kinase dépendante du complexe Ca²⁺-calmoduline de type II ; EC = extracellulaire ; IC = intracellulaire ; IP3R = récepteur à l'inositol-triphosphate ; PKA = protéine kinase dépendante de l'AMPc ; RE = réticulum endoplasmique ; RyR = récepteur à la ryanodine.

Contrairement aux nAChR1, peu d'études se sont intéressées à la régulation des nAChR2 par des voies de signalisation intracellulaire. Par exemple, Safa Mannai et ses collaborateurs ont étudié l'implication de la voie GMPc/PKG dans la régulation de ce sous-type de récepteur (Mannai *et al.*, 2016). En effet, dans une gamme de potentiel correspondant préférentiellement aux nAChR2, l'amplitude des courants ioniques induits par l'application de NIC est augmentée par un traitement avec du GMPc. En revanche, ces courants sont bloqués en présence d'un inhibiteur de la PKG, le KT5823, ou d'un inhibiteur de la guanylate cyclase (GC), l'ODQ. De plus, ce dernier diminue également l'amplitude des courants liés à l'activation des nAChR1. Ainsi, les auteurs suggèrent que la voie de signalisation de la GMPc/PKG participe principalement à la régulation des nAChR2 mais également des nAChR1 dans une moindre mesure. Enfin, la régulation des nAChRs par la PKG semble être dépendante du calcium. En prenant en compte leurs données et celles de la littérature, les auteurs ont proposé un schéma de régulation des nAChRs des neurones DUM de la blatte par la voie de la GMPc/PKG (figure 12).

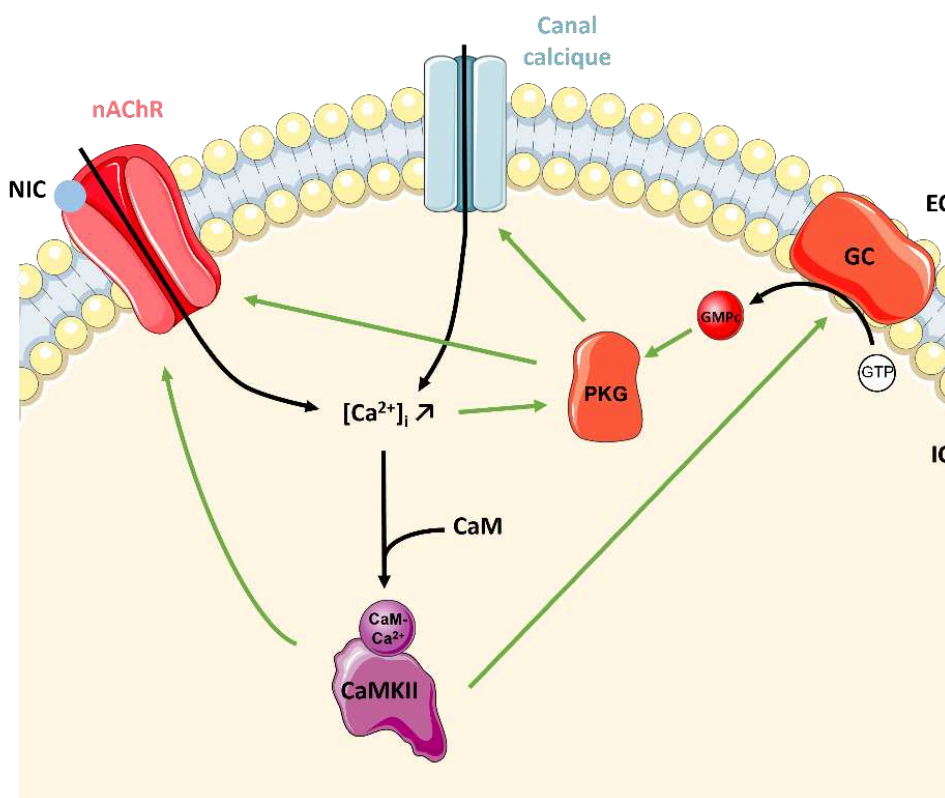


Figure 12 : Représentation schématique de la régulation des nAChRs des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* impliquant la voie GMPc/PKG proposée par Mannai *et al.*, 2016. Les flèches vertes représentent l'activation des différents éléments cellulaires. $[Ca^{2+}]_i$ = concentration calcique intracellulaire ; CaM = calmoduline ; Ca^{2+} -CaM = complexe Ca^{2+} -calmoduline ; CaMKII = protéine kinase dépendante du complexe Ca^{2+} -calmoduline de type II ; EC = extracellulaire ; GC = guanylate cyclase ; GMPc = guanosine-monophosphate cyclique ; GTP = guanosine-triphosphate ; IC = intracellulaire ; PKG = protéine kinase dépendante du GMPc.

Ainsi, de nombreuses voies de signalisation intracellulaire sont impliquées dans la régulation des nAChRs. Parmi ces voies, celles impliquant des variations de calcium intracellulaire présentent un intérêt particulier dans les stratégies de lutte contre les insectes nuisibles. En effet, il a été montré que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ pouvait modifier la pharmacologie des nAChRs et notamment leur sensibilité aux insecticides (Apaire-Marchais *et al.*, 2016; Deshayes *et al.*, 2018).

2.6. Rôles physiologiques associés aux récepteurs nicotiques d'insecte

2.6.1. Implication des récepteurs nicotiques dans le comportement de la mouche *Drosophila melanogaster*

Comme décrit précédemment, l'ACh est le neurotransmetteur principal chez l'insecte. L'importance du système cholinergique chez ces invertébrés suggère son implication dans diverses fonctions biologiques et physiologiques. Des études réalisées chez la mouche *Drosophila melanogaster* se sont attardées sur le rôle des nAChRs, et plus particulièrement des sous-unités nicotiques, dans les divers comportements. Par exemple, l'étude du transcriptome par puce à ADN et l'analyse des profils d'expression de Da1 par RT-PCR ont révélés que la sous-unité Da1 est à la fois exprimée dans les tissus nerveux et reproducteurs de la drosophile

(Chintapalli *et al.*, 2007; Somers *et al.*, 2017). De plus, lorsque les drosophiles sont traitées avec des ARN interférents qui ciblent cette sous-unité, elles arborent des comportements de séduction et de copulation défailants (Somers *et al.*, 2017). En plus de l'implication de cette sous-unité dans le comportement de reproduction, les auteurs suggèrent qu'elle pourrait également participer au comportement de sommeil. En effet, les drosophiles mutantes *Da1^{KO}* ont un rythme de sommeil différent des drosophiles contrôles (Somers *et al.*, 2017). Les sous-unités *Da3*, *Da4*, et *Dβ3* sont également impliquées dans ce comportement (Shi *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Kiah Tasman et ses collaborateurs se sont intéressés à l'impact d'une exposition à des doses sublétales de néonicotinoïdes (IMI, CLO et THI) sur le rythme circadien qui est un rythme biologique modulant le sommeil. Les drosophiles exposées à de telles doses d'insecticides présentent une rythmicité circadienne et un sommeil altérés. De plus, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre les sous-unités *Da1* et *Dβ2* ont permis de mimer ces effets (Tasman *et al.*, 2021). Le système cholinergique est également impliqué dans le comportement de fuite. En effet, les drosophiles qui expriment une sous-unité *Da7* mutée présentent un comportement de fuite défailant en réponse à un stimulus visuel (Fayyazuddin *et al.*, 2006). De manière plus générale, l'implication du système cholinergique dans la locomotion a notamment pu être attestée chez la larve de drosophile par l'identification de gènes orthologues à ceux impliqués dans la locomotion chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Afin d'étudier l'implication de ces gènes dans la locomotion des larves, les auteurs ont utilisés des ARN interférents. Les larves traitées avec des ARN interférents dirigés contre les sous-unités *Da3* et *Da4* présentent une défaillance locomotrice sévère (Aleman-Meza *et al.*, 2017).

2.6.2. Implication des récepteurs nicotiques dans l'apprentissage et la mémoire de l'abeille *Apis mellifera*

Le système cholinergique présente un rôle majeur dans les fonctions cognitives. La majorité des études s'intéressant à l'implication des nAChRs dans la mémoire et l'apprentissage ont utilisé l'abeille *Apis mellifera* comme modèle d'étude (Gauthier, 2010). Des études en neuropharmacologie comportementale ont montré que l'injection de différents antagonistes nicotiques dans le cerveau de l'abeille n'a pas le même effet sur les différentes phases de la mémoire. En effet, alors que l'injection d' α -bgt n'a pas d'effet sur l'apprentissage et le rappel, l'injection de mécamylamine entraîne des perturbations dans le rappel des informations (Lozano *et al.*, 2001). Cependant, il a été montré dans des expériences de conditionnement en plusieurs essais que les injections de MLA et d' α -bgt bloquent uniquement la mémoire à long-terme sans affecter la mémoire à court-terme (Dacher *et al.*, 2005; Gauthier *et al.*, 2006). L'identification dans le génome de l'abeille des différentes sous-unités nicotiques (Jones *et al.*, 2006) a ensuite permis d'utiliser l'ARNi pour étudier le rôle de ces sous-unités dans ces phénomènes d'apprentissage et de mémoire. Par exemple, l'utilisation d'ARN interférents qui ciblent la sous-unité nicotique *Amela8* a permis de déterminer son implication dans la mémoire olfactive et plus précisément dans le rappel de la mémoire (Louis *et al.*, 2012). L'étude de l'impact d'insecticides, notamment des néonicotinoïdes qui ciblent principalement les nAChRs, a également permis d'établir le rôle des nAChRs dans ces fonctions cognitives chez l'abeille. En effet, une étude a démontré que des abeilles ayant consommé du THI présentent un apprentissage altéré et sont incapables de discriminer des odeurs durant des tests de mémoires à court-terme et à long-terme. En revanche, les abeilles qui ont ingéré de l'IMI ou de la CLO peuvent réussir ces tâches mais plus lentement (Mustard *et al.*, 2020). Enfin, une exposition à une dose

sublétale de sulfoxaflor altère l'apprentissage et la mémoire des abeilles. Les auteurs ont pu associer à ces abeilles exposées à cet insecticide des profils d'expression des sous-unités nicotiniques qui diffèrent des abeilles contrôles. Les niveaux d'expression des sous-unités Amela1, Amela3, Amela6, Amela7, Amela9, Amelβ1 et Amelβ2 étaient significativement différents (Cartereau *et al.*, 2022) suggérant que ces sous-unités pourraient être impliquées dans l'apprentissage et la mémoire olfactive chez l'abeille.

3. L'acétylcholinestérase

3.1. Découverte et généralités sur l'acétylcholinestérase

La découverte du premier neurotransmetteur, l'acétylcholine (ACh), a rapidement été suivie par la découverte d'une enzyme capable de l'hydrolyser, l'acétylcholinestérase (AChE). Son existence avait déjà été postulée par Henry Dale en 1914 (Dale, 1914) mais ce n'est que dans les années 1920 que Otto Loewi va démontrer son existence par ses travaux sur l'innervation du cœur de grenouille par le nerf vague parasympathique. Il avait observé que la « substance vague », qui résulte de la stimulation du nerf vague, perdait son effet lorsqu'elle était en contact avec un « extrait aqueux » du cœur (Loewi et Navratil, 1926). Quelques années plus tard, Marnay et Nachmansohn ont démontré que l'AChE est très concentrée à la jonction neuromusculaire du vertébré ainsi que dans l'organe électrique de la torpille *Torpedo californica* et de l'anguille *Electrophorus electricus* (pour revue voir Massoulié *et al.*, 1993). Par la suite, l'AChE a pu être identifiée, séquencée et clonée pour d'autres espèces de vertébrés et invertébrés comme les insectes. Depuis, un nombre conséquent de travaux se sont attardés sur l'étude de cette enzyme comme cible de molécules inhibitrices dans le traitement de diverses pathologies humaines comme la maladie d'Alzheimer (Talesa, 2001; Srivastava *et al.*, 2021) mais également dans la lutte contre les insectes ravageurs de culture et/ou vecteurs de maladie (Fournier *et al.*, 1993; Casida et Durkin, 2013a; Casida et Durkin, 2013b; Mou *et al.*, 2017; Thapa *et al.*, 2017). Aujourd'hui, on peut définir l'AChE comme la cholinestérase principalement responsable de l'hydrolyse de l'ACh dans la synapse cholinergique. La dégradation de ce neurotransmetteur permet de restaurer l'excitabilité neuronale pour permettre la transmission de l'influx nerveux suivant. Cette enzyme peut également être définie mécaniquement comme une sérine hydrolase (Soreq et Seidman, 2001). Dans la synapse, l'hydrolyse de l'ACh par l'AChE va engendrer la libération d'acétate mais également de choline qui sera recyclée par le neurone présynaptique pour la synthèse de ce neurotransmetteur (Soreq et Seidman, 2001). La dégradation de l'ACh par l'AChE est réalisée en quelques millisecondes. De ce fait, elle est considérée comme l'une des enzymes les plus rapides dans la nature. Selon l'espèce considérée, l'AChE peut hydrolyser en moyenne environ 10 000 molécules de substrat par seconde ($k_{cat} = 1,4 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$; Rosenberry, 1975). De plus, son efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) est d'environ $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Bar-Even *et al.*, 2011). Sachant que la limite théorique pour l'efficacité catalytique d'une enzyme est estimée entre 10^8 et $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, l'AChE est considérée comme une enzyme catalytiquement parfaite (Quinn, 1987). De ce fait, il a été suggéré que la diffusion de substrats et de produits, vers et à partir du site actif, constitue l'étape limitante de la réaction d'hydrolyse médiée par cette enzyme (Quinn, 1987). Enfin, une autre cholinestérase, la butyrylcholinestérase, est largement représentée chez les vertébrés et est capable d'hydrolyser l'ACh dans une moindre mesure (Darvesh *et al.*, 2003; Ha *et al.*, 2020). Cette enzyme a notamment été bien caractérisée structurellement et

fonctionnellement mais son rôle biologique n'est pas encore entièrement élucidé (Masson *et al.*, 2009). De plus, l'apparition de la butyrylcholinestérase résulte de la duplication des gènes de l'AChE (Chatonnet et Lockridge, 1989). Pour ces raisons, l'AChE a pu être caractérisée de cholinestérase « véritable » ou « spécifique » et la butyrylcholinestérase de cholinestérase « non-spécifique » ou de « pseudo-cholinestérase » (Ha *et al.*, 2020).

3.2. Structure de l'acétylcholinestérase

3.2.1. Structure générale de l'acétylcholinestérase

Les premières AChE cristallisées ont été obtenues à partir de la torpille *Torpedo californica* (TcAChE) à la fin des années 1980 (Sussman *et al.*, 1988) et leur structure tridimensionnelle a été élucidée quelques années plus tard (Sussman *et al.*, 1991). Par la suite, la structure des AChEs murine (Bourne *et al.*, 1995; Bourne *et al.*, 2006) et humaine (Kryger *et al.*, 2000) a pu être déterminée. Dans le cas des invertébrés, la structure tridimensionnelle de l'AChE de la mouche *Drosophila melanogaster* (DmAChE) a été la première à être résolue (Harel *et al.*, 2000; Nachon *et al.*, 2020). Les différentes AChEs issues de ces espèces présentent des structures similaires (figure 13A). L'AChE est majoritairement retrouvée sous la forme d'un homodimère amphiphile attaché à la membrane plasmique par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). Elle peut également exister sous une forme soluble hydrophile qui est générée à partir de la forme amphiphile sous l'action d'une phospholipase C spécifique du phosphatidylinositol (PI-PLC ; Taguchi *et al.*, 1984; Badiou *et al.*, 2007; Paulick et Bertozzi, 2008). Chaque monomère qui compose la DmAChE est constitué d'un cœur composé de 8 feuillettes β reliés par des hélices α (Harel *et al.*, 2000) et le repliement global de cette enzyme est typique des α/β hydrolases (Ollis *et al.*, 1992; Harel *et al.*, 2000). De plus, il a été rapporté que pour les AChEs dimériques de la torpille (Sussman *et al.*, 1991), de la souris (Bourne *et al.*, 1995), de l'Homme (Kryger *et al.*, 2000), de la drosophile (Harel *et al.*, 2000) mais également du moustique *Anopheles gambiae* (Han *et al.*, 2018), l'existence d'un regroupement de quatre hélices α (ou « 4-helix bundle ») qui permet l'interaction entre les monomères de l'enzyme en plus d'un pont disulfure. L'ACh peut se fixer sur deux sites distincts de l'enzyme : le site actif (ou catalytique) et le site périphérique (ou périphérique anionique). Ce dernier site, qui est composé des acides aminés Glu69, Tyr71, Met153, Trp321 qui est très conservé et Tyr374 (numérotation de la DmAChE ; Harel *et al.*, 2000; Nachon *et al.*, 2020), se situe à l'entrée d'une gorge profonde et étroite. Ce site aurait pour rôle de capturer les substrats et de les orienter de telle sorte à ce qu'ils puissent être transférés au fond de la gorge de l'enzyme où se situe le site actif permettant leur hydrolyse (Bourne *et al.*, 2006; Colletier *et al.*, 2006). L'étude structurale comparative entre la DmAChE et la TcAChE a révélé que le volume de la gorge active de DmAChE équivaut à environ 50% de celle de TcAChE (Harel *et al.*, 2000). Dans ce cas, cette gorge mesure environ 20Å et le diamètre de la partie la plus étroite est de 4,5Å (figure 13B ; Harel *et al.*, 2000). De plus, la gorge est tapissée par les chaînes latérales de résidus aromatiques. Ces résidus au nombre de 13 chez la drosophile permettent le mouvement des substrats chargés positivement, comme l'ACh, jusqu'au site actif, qui contient notamment la triade catalytique de l'enzyme, où l'hydrolyse de l'ACh aura lieu.

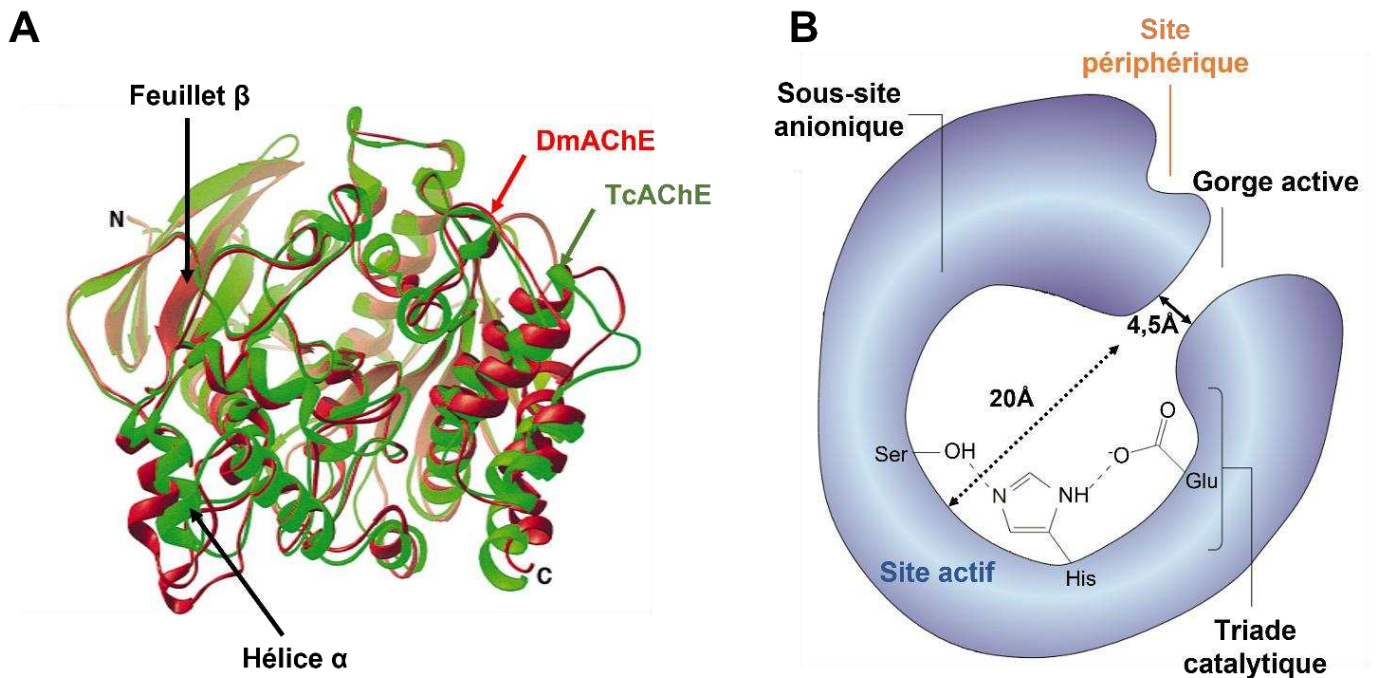


Figure 13 : Structure générale de l'AChE. (A) Représentation schématique des AChEs de la torpille *Torpedo californica* (**TcAChE**) et de la mouche *Drosophila melanogaster* (**DmAChE**) superposées illustrant la similarité structurelle et conformationnelle de ces enzymes. Modifiée d'après Harel *et al.*, 2000. (B) Représentation schématique de la DmAChE et localisation des sites actif et périphérique où peut se fixer l'ACh. Modifiée d'après Soreq et Seidman, 2001. Glu = glutamate ; His = histidine ; Ser = sérine.

3.2.2. Structure du site actif de l'acétylcholinestérase et hydrolyse de l'acétylcholine

Comme décrit précédemment, le site actif est la partie de l'AChE responsable de la réaction d'hydrolyse de l'ACh. L'étude structurale de l'AChE cristallisée et complexée à des analogues structuraux de l'ACh (Bourne *et al.*, 2006; Colletier *et al.*, 2006) ou des inhibiteurs de cette enzyme (Bourne *et al.*, 1995; Harel *et al.*, 2000; Kryger *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 2018; Nachon *et al.*, 2020) a permis d'identifier les composants structuraux clés et les acides aminés conservés du site actif impliqués dans l'interaction ACh-AChE. Au sein de ce site actif, on retrouve la machinerie catalytique de l'enzyme. Cette dernière regroupe notamment (d'après la numérotation des acides aminés de DmAChE ; Harel *et al.*, 2000; Nachon *et al.*, 2020):

- le site estérasique qui contient la triade catalytique (Ser238, Glu367 et His480) et qui est responsable de l'hydrolyse de l'ACh ;
- le sous-site anionique (Trp83, Glu237 et Tyr370) qui permet de stabiliser la portion choline de l'ACh ;
- le trou oxyanion (Gly150, Gly151, Ala239) qui favorise la formation de l'intermédiaire tétraédrique lors de l'hydrolyse de l'ACh ;
- la poche acyle (Trp271, Leu328, Phe330, Phe371 et Phe440) qui permet de stabiliser le groupement méthyle de la portion acétate de l'ACh et qui est impliquée dans la sélectivité du substrat (Harel *et al.*, 1992).

A partir des travaux décrits précédemment, la réaction d'hydrolyse de l'ACh au niveau du site estérasique de l'AChE peut être décrit de façon générale (figure 14) comme suit :

1) Fixation de l'ACh sur l'AChE

Une fois que l'ACh se situe dans la gorge active de l'AChE, celle-ci va interagir au niveau de sa portion acétyle avec le résidu Ser, dit actif, de la triade catalytique de l'enzyme pour former un intermédiaire tétraédrique. Pour ce faire, l'His se comporte comme un catalyseur acido-basique. De par son noyau imidazole, deux liaisons hydrogènes sont formées avec la Ser et le Glu qui jouent, dans cette triade catalytique, le rôle de donneur et d'accepteur final de proton, respectivement. Dans ce cas, l'interaction entre l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle de la Ser active qui est plus nucléophile et l'atome de carbone de la portion acétyle de l'ACh est favorisée.

2) Hydrolyse de l'ACh et libération de la choline

L'His active ainsi protonée va faire don de son proton à la portion choline de l'ACh et va entraîner l'acétylation de la Ser active par estérification. Ainsi, un intermédiaire Acétyle-AChE est formé. Dans ce cas, l'intermédiaire tétraédrique se décompose et la choline est libérée et va ainsi s'échapper du site actif par la gorge. On peut également noter l'existence d'un canal (ou « back-door ») au niveau de la gorge active (Cheung *et al.*, 2018; Nachon *et al.*, 2020). Des expériences de mutagénèse dirigée visant à élargir cette « sortie » ont démontré que lorsque l'ouverture principale de la gorge active est bloquée, les produits de dégradation de l'enzyme peuvent s'échapper de la gorge active par ce canal (Nachon *et al.*, 2008).

3) Régénération de l'AChE

Par la suite, une molécule d'eau nucléophile va « attaquer » le site électrophile du carbonyle de la portion acétyle de l'intermédiaire Acétyle-AChE et libérer le groupement acétate. Ainsi, l'AChE est régénérée.

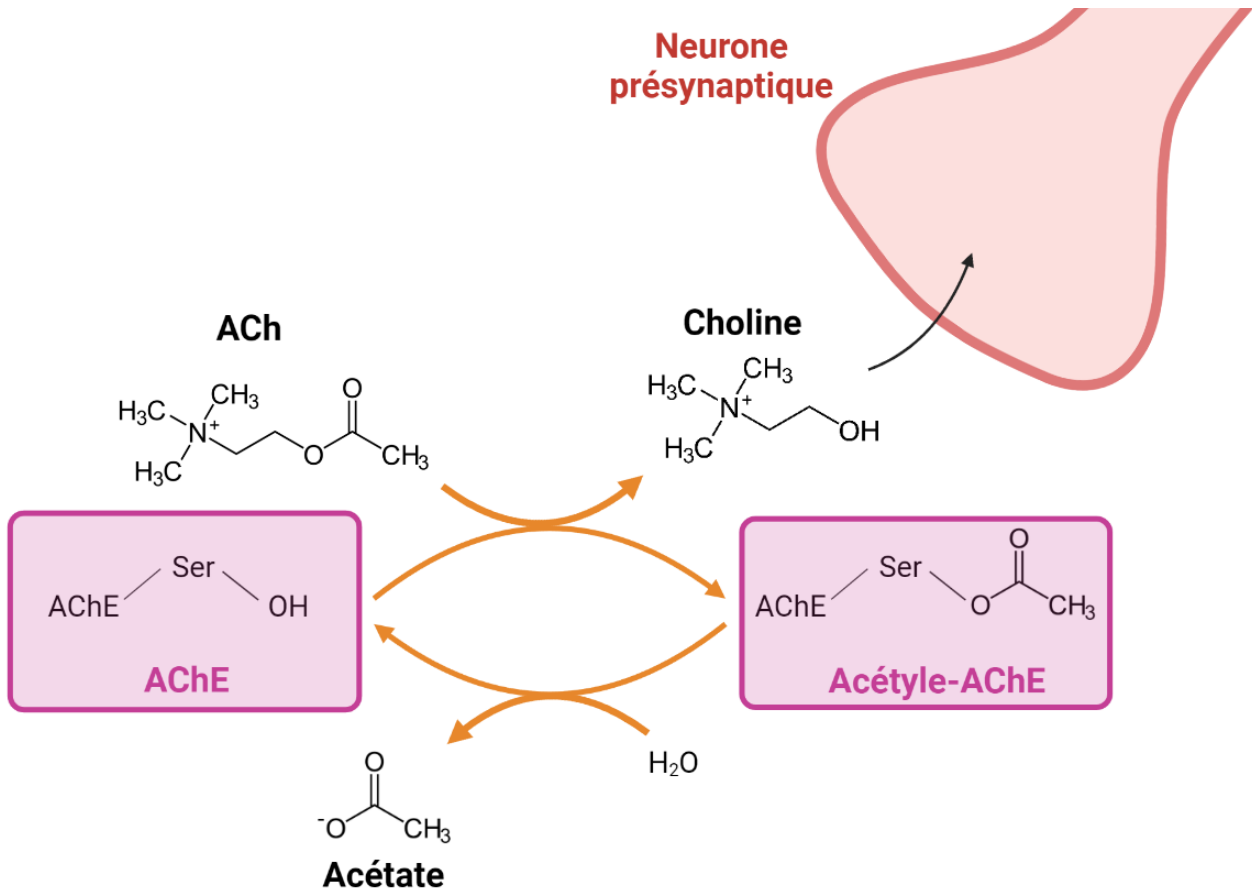


Figure 14 : Représentation schématique de la dégradation de l'ACh par l'AChE dans la synapse cholinergique. L'hydrolyse de l'ACh par l'AChE va induire la production d'un intermédiaire acétyle-AChE pour libérer la choline qui sera recyclée par le neurone présynaptique. L'acétyle-AChE est ensuite hydrolysée pour libérer son groupement acétate et ainsi régénérer l'enzyme libre. Acétyle-AChE = acétylcholinestérase complexée à un acétyle ; ACh = acétylcholine ; AChE = acétylcholinestérase ; Ser = sérine.

3.3. Les différentes acétylcholinestérases chez l'insecte

Chez les invertébrés, des analyses phylogénétiques ont décrit la duplication du gène qui code pour l'AChE (*ace*) au cours de l'évolution (Weill *et al.*, 2002; Kim et Lee, 2013; Cha et Lee, 2015). En effet, jusqu'à quatre gènes *ace* différents ont pu être décrits comme pour le nématode *Caenorhabditis elegans* (Combes *et al.*, 2000; Combes *et al.*, 2001). En revanche, selon les espèces d'insectes, jusqu'à deux gènes *ace* ont pu être identifiés. La majorité des insectes possède ces deux gènes (Li et Han, 2002; Weill *et al.*, 2002; Nabeshima *et al.*, 2003; Nabeshima *et al.*, 2004; Chen et Han, 2006; Huchard *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2012a) mais quelques exceptions n'en possèdent qu'un seul. C'est notamment le cas pour certains insectes de l'ordre des diptères comme les mouches *Drosophila melanogaster* et *Musca domestica* (Kim et Lee, 2013). Il a été suggéré que ces espèces, notamment la drosophile, ne possèdent qu'un seul gène *ace* car la duplication de ce dernier aurait eu lieu avant la différenciation des insectes au cours de l'évolution (Lu *et al.*, 2012a; Cha et Lee, 2015) et qu'elles auraient perdu par la suite l'un des deux gènes *ace* (Weill *et al.*, 2002). Au sein d'une même espèce, ces deux gènes sont considérés comme paralogues. Le premier gène *ace*, nommé *ace1*, code pour l'AChE1. Le second, appelé *ace2*, est quant à lui orthologue du gène *ace2* de *Drosophila melanogaster* et code pour l'AChE2 (Kim et Lee, 2013). L'analyse de l'expression par PCR quantitative (qPCR) des transcrits qui codent pour ces deux AChEs chez des espèces d'insectes qui présentent les gènes *ace1* et *ace2* révèle que l'AChE1 est majoritairement exprimée (Baek *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Seong *et al.*, 2012). De plus, des mutations de la séquence *ace1* associées à des résistances aux composés organophosphorés et aux carbamates, des insecticides inhibiteurs de l'AChE, ont pu être rapportées (Nabeshima *et al.*, 2004; Weill *et al.*, 2004; Alon *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009; Shang *et al.*, 2014; Elanga-Ndille *et al.*, 2019; Rahayu *et al.*, 2022). Pour ces raisons, il est couramment admis que, chez les insectes qui présentent les deux types d'AChE, AChE1 est principalement responsable de l'activité catalytique au niveau synaptique. Cependant, cette notion doit être nuancée. En effet, dans quelques rares cas, une mutation du gène *ace2* a pu être associée à des phénomènes de résistance aux insecticides (Pan *et al.*, 2010; Shang *et al.*, 2014). De plus, une étude visant à déterminer l'AChE majoritairement responsable de l'activité catalytique chez 100 espèces d'insectes issues de 18 ordres différents révèlent que l'AChE1 est principalement responsable de l'activité enzymatique pour 67 d'entre-elles. Pour les 33 autres espèces, l'AChE2 est majoritairement exprimée et est supposée être principalement responsable de l'hydrolyse de l'ACh (figure 15). Parmi ces dernières, on retrouve notamment les insectes qui ne présentent que le gène *ace2* mais également des insectes de l'ordre des Hyménoptères qui regroupe des insectes sociaux tels que l'abeille *Apis mellifera* (Kim et Lee, 2013).

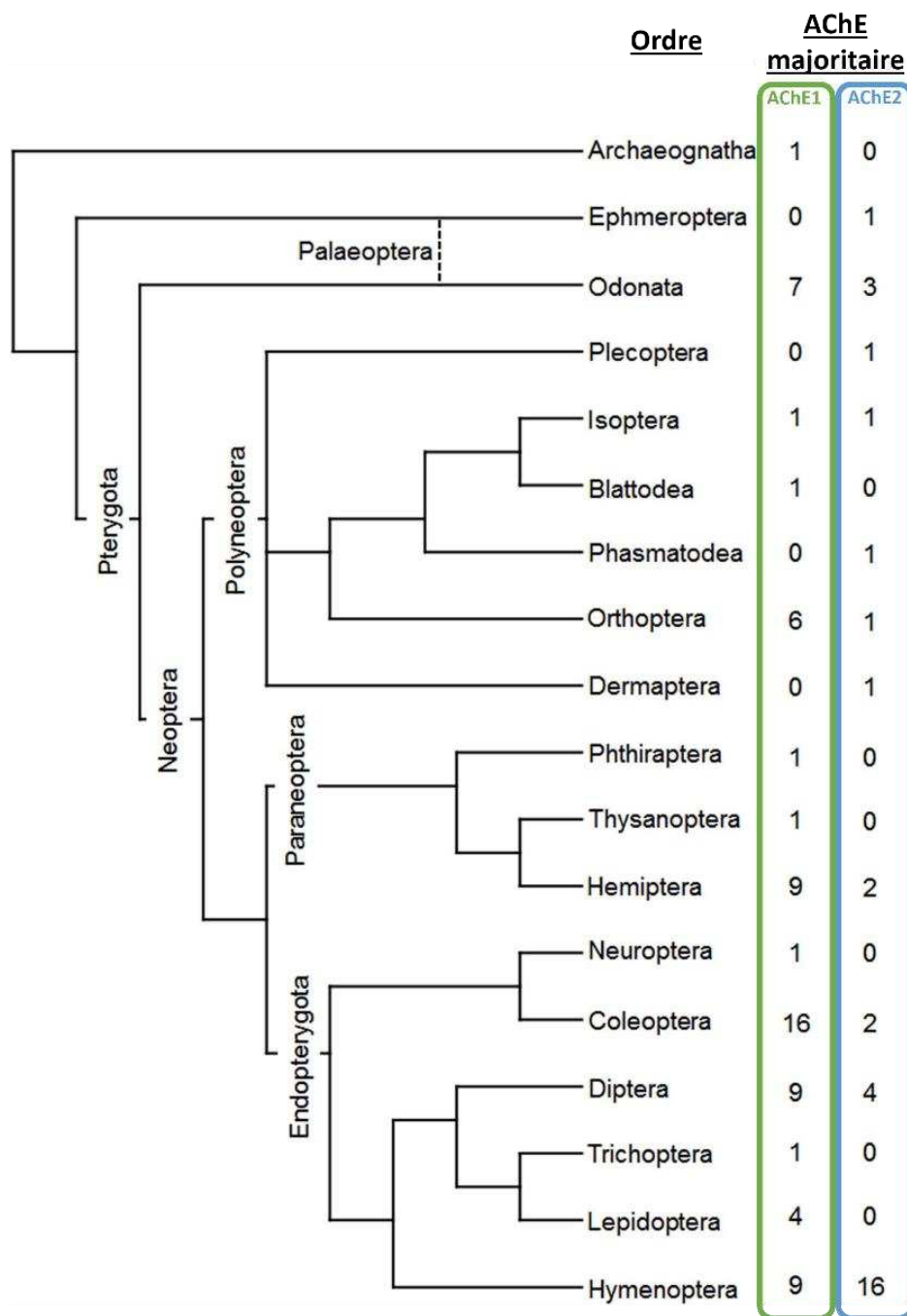


Figure 15 : L'AChE principale chez les insectes. Arbre phylogénétique regroupant 18 ordres d'insectes avec le nombre d'espèces d'insectes exprimant AChE1 ou AChE2 comme enzyme catalytique principale indiqué à droite. Modifiée d'après Kim et Lee, 2013.

3.4. Rôles physiologiques associés à l'acétylcholinestérase d'insecte

Comme décrit précédemment, la fonction principale ou « classique » de l'AChE est d'hydrolyser l'ACh au sein de la synapse. Cependant, d'autres fonctions, en plus de son rôle synaptique, ont pu être décrites chez les insectes. En ce sens, les gènes *ace* ont pu être qualifiés de gènes pléiotropiques (Ye *et al.*, 2017). En effet, à l'instar des vertébrés (Jiang et Zhang, 2008), il a pu être démontré que l'AChE d'insecte est impliquée dans le phénomène d'apoptose neuronale (Knorr *et al.*, 2020; Knorr *et al.*, 2022). Une étude réalisée sur le criquet *Locusta migratoria* a permis de décrire le phénomène d'apoptose en condition hypoxique au sein de préparations neuronales (Knorr *et al.*, 2020). Dans ce même travail, l'étude de l'expression relative de *ace1* (*Lm-ace-1*) par qPCR dans le système nerveux de criquets en condition hypoxique révèle une surexpression de ce dernier. De plus, en culture cellulaire, la survie cellulaire de ces neurones est favorisée par l'utilisation d'un inhibiteur de l'AChE en conditions normoxique et hypoxique. Ainsi, l'AChE d'insecte présenterait un fonction pro-apoptotique.

En plus de son implication dans la mort cellulaire, l'AChE semble également jouer un rôle dans le développement et la locomotion. En effet, chez la larve du papillon *Bombyx mori*, l'utilisation de la technique d'ARNi dirigée contre *ace1* et *ace2* impacte l'activité motrice de ces dernières (Ye *et al.*, 2017). Les auteurs ont aussi conclu que le développement de ces mêmes larves était altéré, se traduisant par un poids diminué par rapport aux larves contrôles. Des résultats similaires ont également été rapportés pour des larves de la pyrale *Chilo suppressalis* (Csace1 ; Hui *et al.*, 2011) et de la teigne *Plutella xylostella* (Pxace1 ; He *et al.*, 2012). De plus, diminuer l'expression des gènes *ace* des larves de l'armigère *Helicoverpa armigera* par la technique d'ARNi impacte également le développement de ces dernières (Kumar *et al.*, 2009).

Enfin, des abeilles *Apis mellifera* exposées à une dose sub létale de coumaphos, un insecticide organophosphoré qui inhibe l'AChE, présentent un apprentissage olfactif et une mémoire à court-terme défaillants (Williamson et Wright, 2013). Ainsi, il peut être suggéré que l'AChE d'insecte présenterait un rôle dans ces fonctions cognitives.

Pour conclure, d'autres fonctions ont pu être associées à l'AChE de vertébrés telles que l'interaction cellules-matrice extracellulaire dans l'os (Inkson *et al.*, 2004), la croissance axonale (Bigbee et Sharma, 2004), la synaptogenèse (Lev-Lehman *et al.*, 2000), la réponse au stress (Zimmerman et Soreq, 2006) ou encore la prolifération cellulaire (Campoy *et al.*, 2016). Cependant, à l'heure actuelle, aucune étude n'a permis d'associer l'AChE de l'insecte à ces fonctions biologiques.

Chapitre 2 : Les insecticides qui ciblent le système cholinergique, résistance et accommodation

1. Historique et généralités sur les insecticides

L'étude de la lutte contre les bioagresseurs peut apparaître, au premier abord, comme une thématique moderne. Cependant, des écrits historiques de Grèce et Rome antique relatant des pratiques pour lutter contre les organismes nuisibles, notamment les insectes, au sein des habitations ou en agriculture ont pu être étudiés. En effet, bien qu'à cette époque les pratiques religieuses ou la « magie populaire » étaient courantes pour tenter d'éloigner les insectes, ces écrits décrivent également l'utilisation de composés naturels d'origines végétale, animale ou minérale, comme le soufre ou l'arsenic, pour éliminer les insectes nuisibles (Smith et Secoy, 1975). Cette dernière pratique s'apparente à ce que l'on définit aujourd'hui comme la lutte chimique, c'est-à-dire, à l'emploi de produits phytopharmaceutiques d'origines naturelle ou synthétique, tels que les insecticides, pour contrôler les populations de bioagresseurs comme les insectes ravageurs de culture et/ou vecteurs de maladie animale, humaine ou végétale. Les insecticides sont classés en fonction de leur mode d'action (MoA pour « Mode of Action »). Jusqu'à la fin des années 1970, quelques principales familles d'insecticides ont représenté la majorité du marché. Les trois MoA qui leur sont associés sont la modulation du canal sodique dépendant du potentiel (Na_v), le blocage du GABAR et l'inhibition enzymatique de l'AChE (Sparks *et al.*, 2019). Cependant, l'émergence et l'augmentation rapide du nombre d'espèces d'insectes résistantes à ces composés (figure 16 ; Sparks *et al.*, 2021) auxquelles s'ajoutent, plus récemment, la notion d'accommodation et l'impact d'une exposition à de faibles doses d'insecticides sur la sensibilité des insectes (Bantz *et al.*, 2018) limitent fortement l'efficacité de ces agents de contrôle. De plus, ces composés présentent des effets néfastes sur l'environnement et la santé animale. En conséquence, de nouvelles familles d'insecticides ont vu le jour favorisant ainsi la diversification de leurs MoAs et de leurs cibles (tableau 10). La majorité de ces insecticides sont neurotoxiques. En particulier, les acteurs du système cholinergique de l'insecte sont des cibles majeures de ces traitements étant donné l'importance de ce dernier dans la physiologie du SNC de l'insecte (Casida et Durkin, 2013a; Ihara *et al.*, 2017). Parmi eux, les insecticides néonicotinoïdes, en particulier l'imidaclopride (IMI), ont été majoritaires sur le marché pendant plusieurs années étant donné leur importante efficacité sur un spectre large d'espèces d'insectes. Dans ce chapitre, les insecticides néonicotinoïdes, les carbamates ainsi que les organophosphorés seront abordés dans un premier temps. Puis, les notions de résistance et d'accommodation à ces traitements insecticides seront discutées.

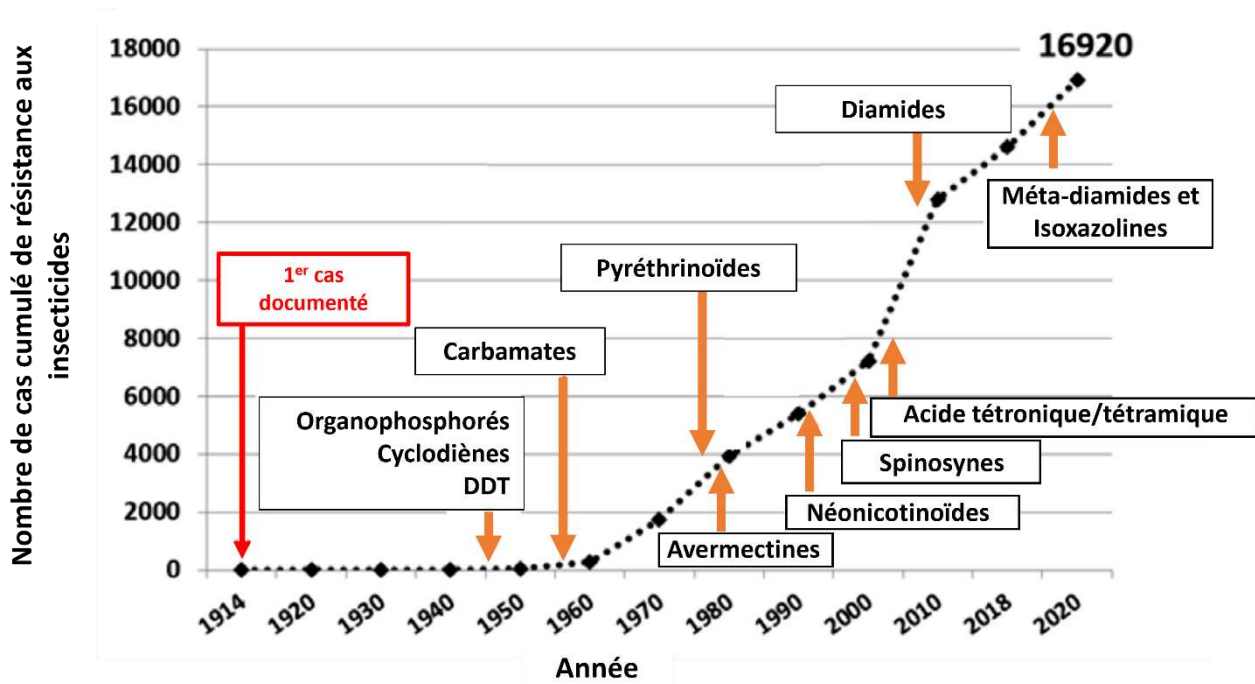


Figure 16 : Représentation graphique du nombre cumulé de cas de résistance à un insecticide associé à la date d'introduction sur le marché de certaines classes majeures d'insecticides. Modifiée d'après Sparks *et al.*, 2021.

Cible principale	Famille d'insecticide	Exemple d'insecticide	Mode d'action
Na_v	Pyréthriinoïdes	Cyperméthrine Téfluthrine λ-cyhalothrine Deltaméthrine	Modulateur
	Organochlorés	DDT	Modulateur
	Oxadiazines	Indoxacarbe	Bloqueur
	Semicarbazones	Métaflumizone	Bloqueur
	N-alkylamides	BTG 502	Bloqueur
	Toxines	ATX-II Tétrodotoxine	Divers
nAChR	Néonicotinoïdes	Imidaclopride Clothianidine Thiaclopride Thiaméthoxame Acetamipride Nitenpyrame Dinotéfurane	Agoniste
	Spinosynes	Spinosad Spinetoram	Modulateur/Agoniste
	Sulfoximines	Sulfoxaflor	Agoniste
	Buténolides	Flupyradifurone	Agoniste
	Mésoioniques	Triflumezopyrim	Antagoniste
	Analogues de la nereistoxine	Cartap	Bloqueur
GABAR	Avermectines	Ivermectine Milbemectine	Modulateur
	Organochlorés cyclodiènes	Lindane Dieldrine	Antagoniste
	Phénylpyrazoles	Fipronil	Antagoniste
	Isoxazolines	Fluxametamide	Antagoniste
GluCl	Avermectines	Ivermectine Emamectine	Modulateur/Agoniste
	Phénylpyrazoles	Fipronil	Antagoniste
	Isoxazolines	Fluxametamide	Antagoniste
AChE	Organophosphorés	Chlorpyrifos Phosmet	Inhibition enzymatique
	Carbamates	Pirimicarbe Oxamyle	Inhibition enzymatique
Ca_v et BK_{ca}	Toxines	GS-ω/κ-Htx-Hv1a	Bloqueur
OR	Formamidines	Amitraze	Agoniste
Canaux TRPV	Pyridines azométhines	Pymétrozine	Agoniste
RyR	Diamides	Flubendiamide Chlorantraniliprole	Agoniste

Tableau 10 : Tableau non-exhaustif des cibles des insecticides avec les familles d'insecticides neurotoxiques associées. ACET = acétamipride ; AChE = acétylcholinestérase ; BK_{ca} = canal potassique activé par le potentiel et la concentration en calcium intracellulaire ; Ca_v = canal calcique dépendant du potentiel ; GABAR = récepteur GABAergique ; GluCl = récepteur glutamatergique ; nAChR = récepteur cholinergique de type nicotinique ; Na_v = canal sodique dépendant du potentiel ; OR = récepteur octopaminergique ; RyR = récepteur à la ryanodine. Modifié d'après Collet et Raymond, 2022.

2. Les insecticides qui ciblent le système cholinergique

2.1. Les néonicotinoïdes

2.1.1. Structure chimique

Les néonicotinoïdes tirent leur origine de la nithiazine, un composé présentant un effet insecticide modéré (Matsuda *et al.*, 2001) et qui est un agoniste des nAChRs (Buckingham *et al.*, 1995; Matsuda *et al.*, 2020). Ce dernier a été développé dans les années 1970 dans le but de remplacer les insecticides sur le marché, notamment les pyréthri-noïdes, pour lesquels des cas de résistances avaient été rapportés. Cependant, la photo-instabilité de ce composé a empêché sa commercialisation. Dans les années 1990, l'IMI, le premier néonicotinoïde commercialisé, est développé à partir de la nithiazine. Dans ce cas, l'ajout d'un groupement 1-chloro-3-pyridil et le remplacement du groupement nitrométhylène par un groupement nitroimine a permis d'augmenter l'efficacité de la molécule ainsi que sa photo-stabilité (Bai *et al.*, 1991; Kagabu, 2011; Matsuda *et al.*, 2020). Au cours des années qui ont suivi, le nombre d'insecticides néonicotinoïdes développé a augmenté et sept d'entre eux ont été retrouvés sur le marché français avant d'avoir été interdits ces dernières années : l'IMI, la clothianidine (CLO), le thiaclopride (THI), le thiaméthoxame (THIAM), le dinotéfurane, le nitempyrane, et l'acétamipride (ACET). Les néonicotinoïdes sont regroupés en trois groupes qui se distinguent par leur structure chimique (Casida, 2018) : les nitroimines (-NNO₂), les cyanoimines (-NCN) et les nitrométhylènes (-CHNO₂) ; figure 17).

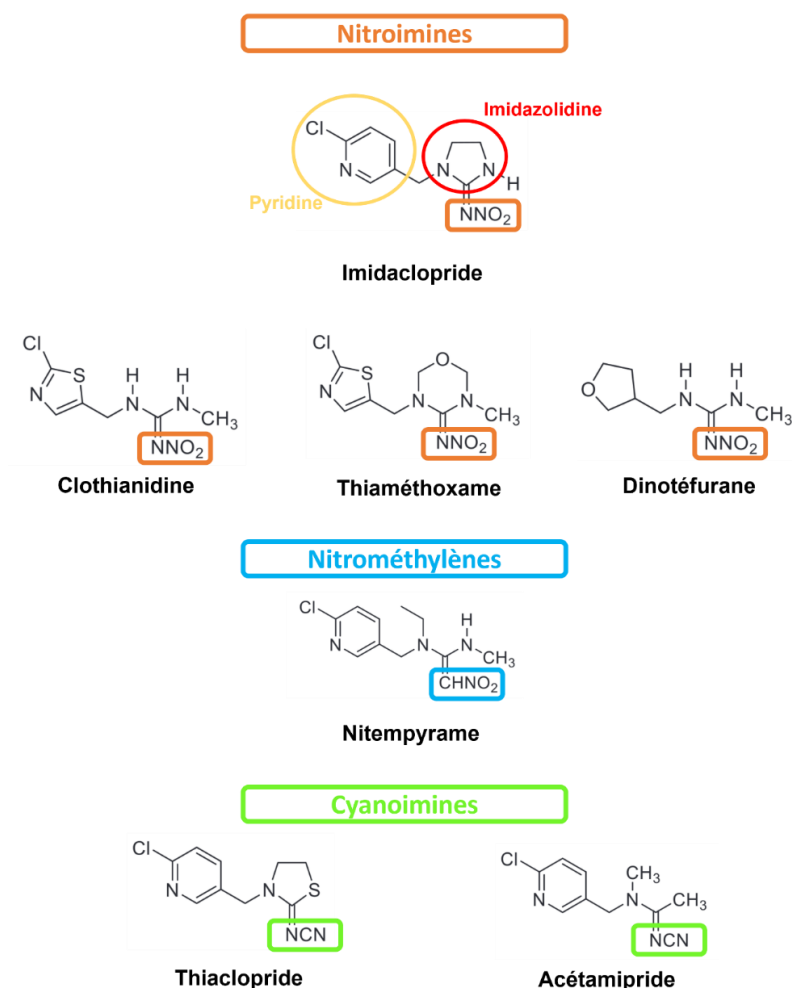


Figure 17 : Structure chimique des insecticides néonicotinoïdes. Les groupements qui permettent de catégoriser les néonicotinoïdes sont les suivants : nitroimine (-NNO₂) en orange, nitrométhylène (-CHNO₂) en bleu et cyanoimine (-NCN) en vert. Pour l'imidaclopride, les noyaux pyridine et imidazolidine caractéristiques de cet insecticide sont indiqués en jaune et rouge respectivement.

2.1.2. Diversité des modes d'action des néonicotinoïdes

Selon le classement proposé par l'IRAC (Insecticide Resistance Action Committee), les néonicotinoïdes appartiennent au groupe 4A regroupant les modulateurs compétitifs des nAChRs (Sparks *et al.*, 2021). Dans la littérature, les néonicotinoïdes sont majoritairement présentés comme des agonistes des nAChRs et permettent ainsi de mimer l'effet de l'ACh sur ces récepteurs (Matsuda *et al.*, 2001; Matsuda *et al.*, 2009; Selvam et Srinivasan, 2019). Cette action agoniste se traduit par une activation prolongée des nAChRs post-synaptiques conduisant à leur désensibilisation. A l'échelle de l'organisme, ces effets se traduiront par des tremblements et des mouvements anarchiques de l'insecte suivis par la paralysie et la mort éventuelle de ce dernier. Cependant, l'étude de l'effet des néonicotinoïdes, notamment par une approche électrophysiologique sur des préparations neuronales d'insectes ou des nAChRs d'insectes exprimés en système hétérologue, a permis d'illustrer la diversité d'action des néonicotinoïdes (tableau 11). Par exemple, des effets agoniste, antagoniste et modulateur ont déjà été rapportés pour l'IMI. Dans ce cas, il apparaît plus juste de définir les néonicotinoïdes comme des modulateurs compétitifs des nAChRs d'insectes.

Insecticide néonicotinoïde	Mode d'action	Préparation neuronale ou nAChR natif/recombiné/hybride	Réf
Imidaclopride	Agoniste partiel	Neurones des ganglions thoraciques (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Tan <i>et al.</i> , 2007
		Neurones du lobe antennaire (<i>Apis mellifera</i> adulte)	Barbara <i>et al.</i> , 2008
		Da2/β2 de poulet	Ihara <i>et al.</i> , 2003
		Cellules de Kenyon (<i>Apis mellifera</i> adulte)	Dupuis <i>et al.</i> , 2011
		Neurones du dernier ganglion abdominal (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Ihara <i>et al.</i> , 2006
	Agoniste (efficacité non-communiquée ou non-déterminée)	nAChRN (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Salgado et Saar, 2004
		nAChRD (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Salgado et Saar, 2004
		nAChR1 (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Courjaret et Lapied, 2001
	Modulateur	Pamea7	Cartereau <i>et al.</i> , 2021
Antagoniste	Amela5	Mitchell <i>et al.</i> , 2022	
Thiaclopride	Agoniste partiel	Neurones des ganglions thoraciques (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Tan <i>et al.</i> , 2007
	Antagoniste	Pamea7	Cartereau <i>et al.</i> , 2021
Clothianidine	Super agoniste	Da2/β2 de poulet	Ihara <i>et al.</i> , 2004
	Agoniste plein	Neurones des ganglions thoraciques (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Tan <i>et al.</i> , 2007
		Neurones DUM (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Thany, 2009
	Agoniste partiel	Neurones du dernier ganglion abdominal (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Ihara <i>et al.</i> , 2006
	Agoniste (efficacité non-communiquée ou non-déterminée)	nAChRD (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Salgado et Saar, 2004
		nAChR1 (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Thany, 2009
		nAChR2 (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Thany, 2009
Acétamipride	Agoniste partiel	Neurones des ganglions thoraciques (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Tan <i>et al.</i> , 2007
	Agoniste (efficacité non-communiquée ou non-déterminée)	nAChR1 (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Bodereau-Dubois <i>et al.</i> , 2012
		nAChR2 (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Bodereau-Dubois <i>et al.</i> , 2012
Thiaméthoxame	Agoniste (efficacité non-communiquée ou non-déterminée)	nAChRN (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Nauen <i>et al.</i> , 2003
		nAChRD (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Nauen <i>et al.</i> , 2003
Dinotéfurane	Agoniste partiel	Neurones des ganglions thoraciques (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Tan <i>et al.</i> , 2007
	Agoniste (efficacité non-communiquée ou non-déterminée)	nAChRN (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Salgado, 2021
		nAChRD (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Salgado, 2021
Nitempyrame	Agoniste plein	Neurones des ganglions thoraciques (<i>Periplaneta americana</i> adulte)	Tan <i>et al.</i> , 2007
	Agoniste partiel	Da2/β2 de poulet	Ihara <i>et al.</i> , 2003
		Da1/β2 de poulet	Ihara <i>et al.</i> , 2003

Tableau 11 : Tableau non-exhaustif de l'effet d'insecticides néonicotinoïdes sur des préparations neuronales d'insectes ou des nAChRs natifs, recombinés ou hybrides.

2.1.3. Interaction néonicotinoïdes-nAChRs d'insecte

Comme cité précédemment, les insecticides néonicotinoïdes peuvent être décrits comme des modulateurs compétitifs des nAChRs d'insectes. De ce fait, ils interagissent avec ces derniers au niveau des sites orthostériques sur lesquels ils se fixent. L'étude structurale de l'AChBP cristallisée, isolée à partir de l'escargot *Lymnaea stagnalis*, complexée à l'IMI, à un analogue nitrométhylène de l'IMI (CH-IMI) ou à un métabolite de l'IMI qui ne présente pas de groupe nitro (-NO₂) a permis d'identifier les acides aminés clés du site orthostérique dans l'interaction néonicotinoïdes-nAChRs d'insectes (Ihara *et al.*, 2015; Ihara et Matsuda, 2018). Pour rappel, le site orthostérique met en jeu les boucles A à F présentes dans la partie amino-terminale des sous-unités nicotiques (voir chapitre 2.2.3). L'atome d'azote du cycle aromatique de l'IMI forme des liaisons hydrogène avec le résidu Leu112 de la boucle E par l'intermédiaire d'une molécule d'eau. L'atome de chlore du groupement pyridine de l'IMI interagit quant à lui avec le résidu Met114 de la même boucle par une liaison halogène. Le groupement imidazolidine est lié au résidu Trp143 de la boucle B par une liaison covalente et est recouvert par le cycle aromatique du résidu Tyr185 de la boucle C. Le groupement nitro interagit également de manière indirecte avec l'acide aminé Tyr164 de la boucle F. De plus, le groupement -NO₂ de l'IMI interagit avec l'acide aminé Gln55 de la boucle D *via* une liaison hydrogène (figure 18B). Ce résidu Gln55 est équivalent aux acides aminés basiques tels que l'acide aminé Arg fréquemment retrouvé au sein des sites orthostériques des nAChRs d'insectes (Brejc *et al.*, 2001). Des expériences de mutagenèse dirigée sur l'AChBP ont permis de valider l'importance de la boucle D dans la sélectivité des néonicotinoïdes pour les nAChRs d'insectes. En effet, en remplaçant le résidu Gln55 sur l'AChBP par l'acide aminé Arg que l'on retrouve dans le domaine extracellulaire d'un nAChR d'insecte, il a été démontré que cette Arg interagissait avec l'IMI mais également avec d'autres néonicotinoïdes comme la CLO et le THI (Ihara *et al.*, 2014). D'autres expériences de mutagenèse dirigée réalisées sur le nAChR homomérique $\alpha 7$ de poulet ont permis de faire la même conclusion. Dans ce cas, le remplacement du résidu Gln79 (qui correspond à Gln55 de l'AChBP) par une Arg permet d'augmenter la sensibilité du récepteur à l'IMI (Shimomura *et al.*, 2002). De plus, la mutation Thr77Arg dans la boucle D du nAChR $\alpha 4\beta 2$ aviaire induit également une augmentation de la sensibilité du récepteur à l'IMI (Shimomura *et al.*, 2006; Toshima *et al.*, 2009). Ainsi, les acides aminés basiques, qui sont fréquemment retrouvés dans la boucle D des sites orthostériques des nAChRs d'insectes, semblent jouer un rôle prépondérant dans la sélectivité des néonicotinoïdes pour les nAChRs d'insectes.

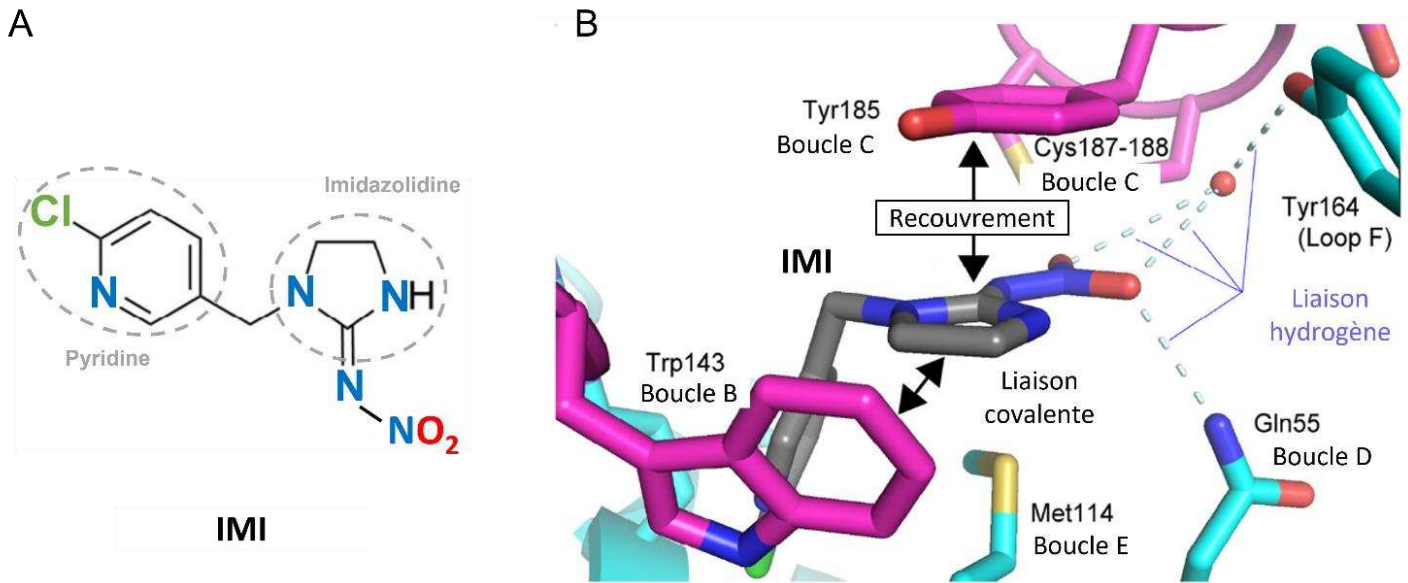


Figure 18 : Interaction entre l'imidaclopride (IMI) et le site orthostérique d'un nAChR d'insecte. (A) Structure chimique de l'IMI. (B) Représentation schématique des interactions entre l'imidaclopride et les boucles B, C, D, E et F de l'AChBP de *Lymnaea stagnalis*. Les atomes de chlore, azote et oxygène sont représentés en vert, bleu et rouge respectivement. Modifiée d'après Ihara *et al.*, 2015.

D'autres déterminants structuraux sont impliqués dans l'interaction néonicotinoïdes-nAChRs d'insectes. L'étude structurale de l'AChBP cristallisée qui porte la mutation Gln55Arg citée précédemment et complexée avec des analogues de l'IMI a révélé que le groupement $-NO_2$ de l'IMI interagissait également avec la Lys34 portée par le brin $\beta 1$ qui forme une boucle supplémentaire, la boucle G (figure 19B; Ihara *et al.*, 2015). Le rôle de la boucle G dans la liaison des nAChRs aux néonicotinoïdes a également été mis en évidence par l'étude de deux autres mutations. En effet, la mutation Ser58Lys du nAChR homomérique $\alpha 7$ aviaire augmente l'effet des néonicotinoïdes et la présence d'une double mutation Ser58Lys et Gln79Arg augmente davantage cet effet (Ihara *et al.*, 2014; Ihara *et al.*, 2015). Ainsi, il est suggéré que les résidus basiques de la boucle G sont également importants pour l'interaction entre les néonicotinoïdes et les nAChRs d'insectes. Enfin, des travaux réalisés sur des nAChRs hybrides composés des sous-unités Da1 ou Da2 de la mouche *Drosophila melanogaster* et $\beta 2$ de poulet ont mis en évidence que ces sous-unités α présentent des composants structuraux facilitant l'action des néonicotinoïdes (Matsuda *et al.*, 1998; Ihara *et al.*, 2003). Plus tard, il a été démontré que le motif YXCC (Tyr-X-Cys-Cys) de la boucle C est important pour l'action des néonicotinoïdes. Chez les insectes, le résidu X correspond fréquemment à une proline et facilite l'interaction entre les néonicotinoïdes, notamment l'IMI, et les nAChRs (Shimomura *et al.*, 2004). De plus, l'insertion d'un polypeptide dans la boucle F des sous-unités nicotiniques d'insectes pourrait favoriser l'interaction entre les néonicotinoïdes et les nAChRs d'insectes (Shimomura *et al.*, 2004; Jones et Sattelle, 2010).

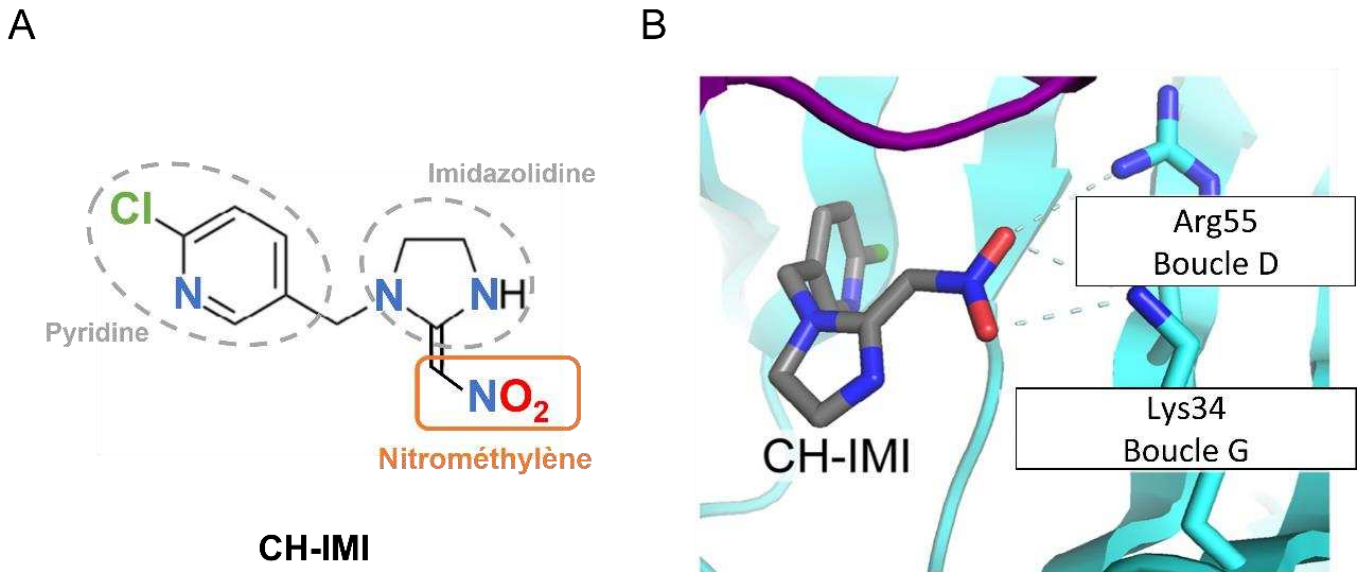


Figure 19 : Interaction entre l'imidaclopride (IMI) et la boucle G des sites orthostériques des nAChRs d'insectes. (A) Structure chimique de l'analogue nitrométhylène de l'imidaclopride (CH-IMI). Dans ce cas, le groupe nitroimine a été remplacé par un groupement nitrométhylène encadré en orange. (B) Représentation schématique de l'interaction entre le CH-IMI et les boucles D et G de l'AChBP de l'escargot *Lymnaea stagnalis* qui porte la mutation Gln55Arg. Les atomes de chlore, azote et oxygène sont représentés en vert, bleu et rouge respectivement. Modifiée d'après Ihara *et al.*, 2015.

2.2. Les insecticides qui ciblent l'acétylcholinestérase

2.2.1. Structure chimique

Les carbamates et les organophosphorés sont des familles d'insecticides qui inhibent l'activité enzymatique de l'AChE (Casida et Durkin, 2013a; Casida et Durkin, 2013b; Thapa *et al.*, 2017). Bien que leur mode d'action soit semblable, les insecticides carbamates et organophosphorés présentent des structures chimiques différentes. Les carbamates dérivent tous de l'acide carbamique et présentent une structure générale commune (figure 20A ; King et Aaron, 2015). Les groupements R₁ et R₂ vont généralement correspondre à un hydrogène et un méthyle respectivement. Cependant, des exceptions peuvent être présentées comme le pirimicarbe qui arbore deux groupements méthyle (figure 20A). De plus, le groupement R₃ correspond majoritairement à un hétérocycle. Les insecticides organophosphorés sont, quant à eux, des molécules complexes correspondant majoritairement à des esters, des amides ou des dérivés thiols de l'acide phosphorique (Vale et Lotti, 2015). Une structure chimique générale des insecticides organophosphorés peut également être présentée (figure 20B ; King et Aaron, 2015; Vale et Lotti, 2015).

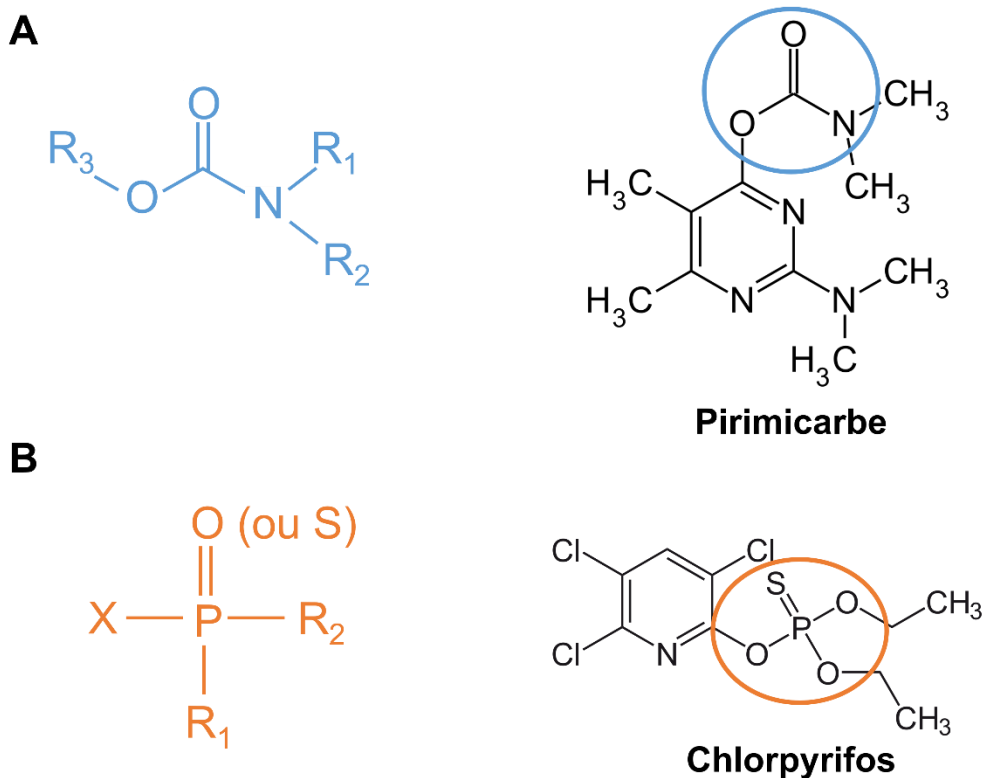


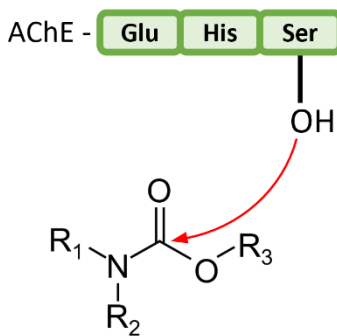
Figure 20 : Structure chimique des insecticides carbamates et organophosphorés. (A) Structure chimique générale et commune aux carbamates. Il est entouré, sur la structure chimique du pirimicarbe à droite, le groupement commun aux insecticides de cette famille. (B) Structure chimique générale et commune aux organophosphorés. Il est entouré, sur la structure chimique du chlorpyrifos à droite, le groupement commun aux insecticides de cette famille.

2.2.2. Mode d'action

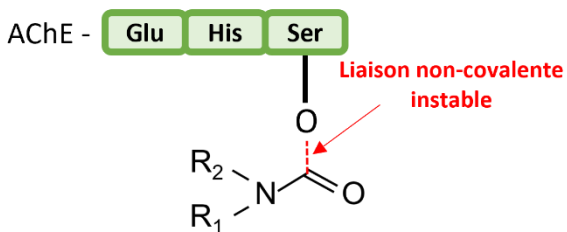
Les insecticides qui ciblent l'AChE d'insecte et qui sont plus généralement des inhibiteurs d'AChE peuvent être classés en fonction de leur MoA. En effet, on peut différencier les inhibiteurs d'AChE qui inhibent l'enzyme de façon réversible et irréversible (Thapa *et al.*, 2017). Les carbamates appartiennent au premier groupe et les organophosphorés, au deuxième. Il est proposé, dans la figure 21, une représentation schématique de l'inhibition de l'AChE par les carbamates et les organophosphorés (Fukuto, 1990; Thapa *et al.*, 2017). Leur MoA suit la réaction d'hydrolyse de l'ACh par l'AChE décrite dans la partie 3.3.2 du premier chapitre. Cette différence dans leur MoA s'explique notamment par la stabilité plus importante de la liaison covalente créée lors de la phosphorylation de la Ser active de la triade catalytique de l'enzyme sous l'effet d'un organophosphoré. Dans ce cas, l'enzyme est incapable de se régénérer et est alors dans un état dit de « vieillissement » (ou « aging » ; Ekström *et al.*, 2006). Enfin, l'inhibition de cette enzyme par des carbamates ou des insecticides organophosphorés va engendrer l'accumulation d'ACh dans la fente synaptique puis une hyperexcitabilité du neurone post-synaptique et la mort éventuelle de l'insecte (Aygun *et al.*, 2002; Thapa *et al.*, 2017).

CARBAMATES

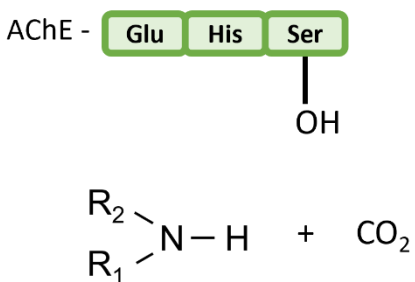
1) Fixation



2) Hydrolyse/Carbamylation

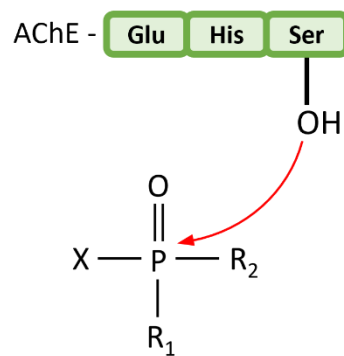


3) Régénération

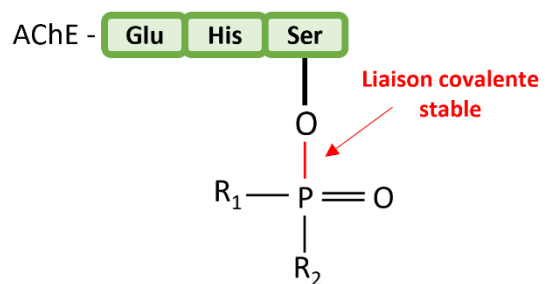


ORGANOPHOSPHORÉS

1) Fixation



2) Hydrolyse/Phosphorylation



3) Vieillessement

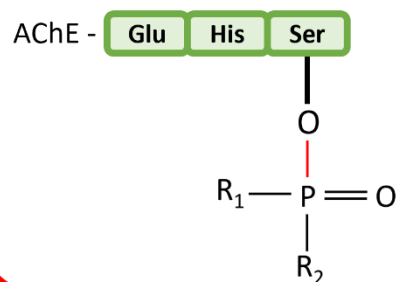


Figure 21 : Mode d'action des insecticides carbamates et organophosphorés. L'inhibition enzymatique de l'AChE par les carbamates est réversible alors que pour les organophosphorés, elle est irréversible. Les étapes où l'enzyme est inhibée sont encadrées en rouge.

3. Les phénomènes de résistance aux insecticides

La résistance aux insecticides est définie par le CNEV (Centre national d'Expertise sur les Vecteurs) comme la diminution héréditaire de la sensibilité à ces composés (CNEV, 2014). En 1914, le premier cas documenté de résistance à un insecticide a été rapporté (Melandar, 1914). Depuis lors, les cas de résistance aux insecticides n'ont fait qu'augmenter jusqu'à devenir aujourd'hui un problème environnemental, économique et sanitaire majeur. De plus, ces mécanismes peuvent s'accompagner de phénomènes de résistance croisée à d'autres insecticides qui possèdent une structure chimique et/ou un MoA différents (Ffrench-Constant et Roush, 1991; Longhurst *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2017; Fujii *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2021; Watson *et al.*, 2021). Les phénomènes de résistance aux insecticides apparaissent alors comme un facteur limitant l'efficacité de ces composés ainsi que le développement de nouvelles molécules insecticides. Ainsi, de nombreuses études se sont attardées sur l'élucidation de ces résistances et des mécanismes responsables de cette diminution de sensibilité aux insecticides (figure 22). Les principaux mécanismes sont les suivant :

- la résistance cuticulaire (ex : épaissement de la cuticule ; Balabanidou *et al.*, 2018; Balabanidou *et al.*, 2019) ;
- la résistance comportementale (ex : comportement d'évitement ; Chareonviriyaphap *et al.*, 2013) ;
- la séquestration des molécules insecticides (Hemingway, 2000; Dermauw et Van Leeuwen, 2014; Pavlidi *et al.*, 2018) ;
- la résistance métabolique (ex : augmentation de l'expression des enzymes de détoxification ; Xu *et al.*, 2005; Nardini *et al.*, 2017) ;
- la modification des protéines cibles des insecticides (ex : mutation ponctuelle ; Silva *et al.*, 2014; Mezei *et al.*, 2022).

Dans cette partie, la résistance métabolique et la modification des protéines cibles des insecticides seront discutées plus en détail.

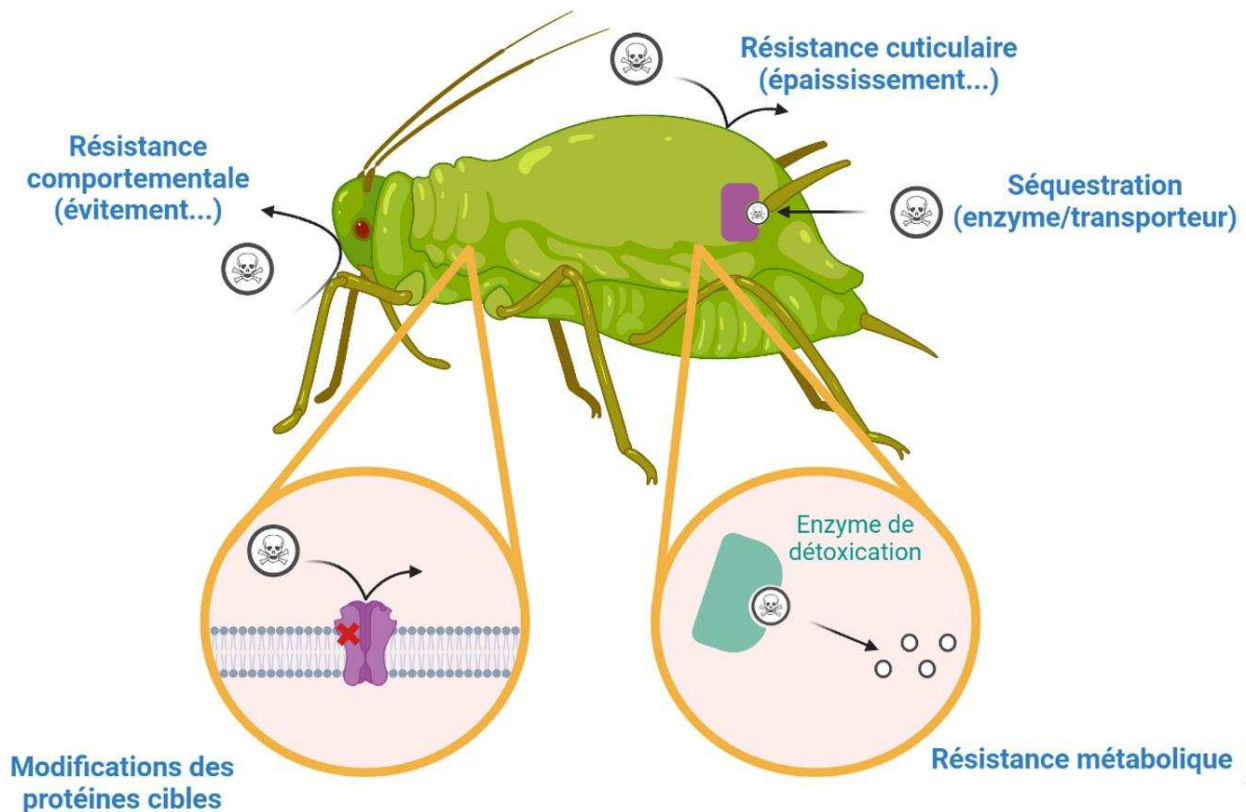


Figure 22 : Représentation schématique des principaux mécanismes de résistances aux insecticides.

3.1. La résistance métabolique

La résistance métabolique fait référence aux processus biochimiques capables de transformer des substances xénobiotiques, comme les insecticides naturels ou synthétiques, en métabolites généralement moins toxiques afin de limiter leur interaction avec leurs cibles moléculaires et favoriser leur excrétion (Hafeez *et al.*, 2022). En revanche, il est important de noter que certains de ces métabolites sont autant voire plus toxiques que l'insecticide. Par exemple, l'IMI présente de nombreux métabolites toxiques comme l'oléfine et le THIAM peut être métabolisé en un second insecticide néonicotinoïde, la CLO (Suchail *et al.*, 2004; Simon-Delso *et al.*, 2015). Ces processus de transformations biochimiques des insecticides impliquent principalement des enzymes comme des cytochromes P450 (CYP450s), des glutathion S-transférases (GSTs) et des carboxylestérases (CEs). Ces enzymes sont généralement surexprimées chez les insectes résistants. Le processus biochimique principal de détoxification des insecticides impliquant ces enzymes peut être schématisé de la façon suivante (figure 23 ; Dawkar *et al.*, 2013; Hafeez *et al.*, 2022) :

- **Phase I** : Métabolisation de l'insecticide par des CYP450s ou des CEs.
- **Phase II** : Conjugaison des métabolites par des GSTs pour faciliter leur excrétion.
- **Phase III** : Fixation des métabolites conjugués à des transporteurs membranaires comme les « ATP-binding cassettes » (ABC) pour les sortir de la cellule.

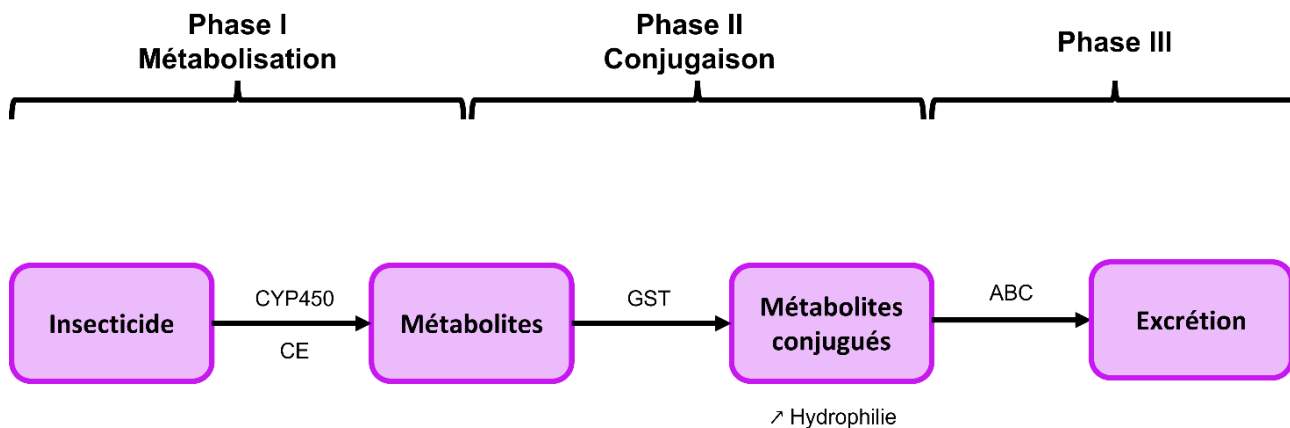


Figure 23 : Représentation schématique du mécanisme de détoxification des xénobiotiques comme les insecticides. ABC = ATP-binding cassette ; CE = carboxylestérase ; CYP450 = cytochrome P450 ; GST = glutathion S-transférase.

Les CYP450s sont des monooxygénases impliquées dans le métabolisme oxydatif d'un nombre important de molécules toxiques très variées (phase I). Chez les insectes, ces enzymes sont codées par une importante superfamille de gènes *CYP* (Hafeez *et al.*, 2022). Des tests toxicologiques couplés à l'utilisation de pipéronyle butoxyde (PBO), un inhibiteur des CYP450s, réalisés sur des souches de mouche *Musca domestica*, de blatte *Blattella germanica* et de moustique *Culex quinquefasciatus* sensibles et résistantes à la perméthrine, un insecticide de la famille des pyréthrinoïdes, a permis de démontrer l'implication de ces enzymes dans le développement de résistances aux pyréthrinoïdes chez ces insectes (Chandre *et al.*, 1998; Liu et Yue, 2000; Pridgeon *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005). De plus, l'analyse de l'expression de certains gènes *CYP* dans divers souches d'insectes résistants aux pyréthrinoïdes révèle une surexpression de ces derniers (Liu et Scott, 1998; Zhu et Liu, 2008; Zhu *et al.*, 2008a; Zhu *et al.*, 2008b; Liu *et al.*, 2011; Yang et Liu, 2011). D'autres travaux ont rapporté l'implication des CYP450s dans la résistance aux insecticides comme le DDT (Festucci-Buselli *et al.*, 2005), le sulfoxaflor (Ma *et al.*, 2019) et l'IMI (Zewen *et al.*, 2003; Elzaki *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). Enfin, il peut être souligné que l'utilisation de la technique d'ARNi dirigée contre une séquence consensus des gènes *CYP4* a permis de restaurer la sensibilité à l'IMI d'une souche de psylle asiatique *Diaphorina citri* résistante à cet insecticide (Killiny *et al.*, 2014).

Les GSTs sont impliquées dans la phase II du processus de détoxification des xénobiotiques. Elles permettent la conjugaison des métabolites avec un groupement glutathion afin d'augmenter leur hydrophilie et de faciliter leur excrétion par la cellule. Elles peuvent également participer à la phase de métabolisation (Pavliidi *et al.*, 2018). Tout comme les CYP450s, l'implication des GSTs dans la résistance aux insecticides a pu être démontrée par des tests toxicologiques avec un insecticide et un inhibiteur de l'enzyme, comme le diéthyl maléate (DEM) ainsi que par des mesures d'activités enzymatiques et de l'expression des gènes qui codent pour les GSTs. Ainsi, diverses GSTs sont impliquées dans la résistance à plusieurs classes majeures d'insecticides (Pavliidi *et al.*, 2018) comme les pyréthrinoïdes (Nardini *et al.*, 2017), les organophosphorés (Lu *et al.*, 2016) et les néonicotinoïdes (Yang *et al.*, 2016; He *et al.*, 2018). De plus, l'utilisation de la technique d'ARNi dirigée

contre le gène GST14 a permis d'augmenter la sensibilité au THIAM de souches d'aleurode du tabac *Bemisia tabaci* résistantes à cet insecticide (Yang *et al.*, 2016) confirmant ainsi le rôle de cette GST dans la résistance au THIAM.

Les estérases, comme les CEs, catalysent l'hydrolyse de liaisons esters et participent ainsi à la métabolisation des xénobiotiques mais dans une moindre mesure (phase I). L'implication de ces enzymes dans la résistance aux pyréthrinoïdes (Feng *et al.*, 2018) et organophosphorés (Alon *et al.*, 2008; Poupardin *et al.*, 2014; Grigoraki *et al.*, 2017) a notamment pu être rapportée.

3.2. Modifications des protéines cibles des insecticides

L'analyse des séquences protéiques des cibles des insecticides issues de souches d'insectes résistantes à un ou plusieurs de ces composés a permis d'identifier des mutations ponctuelles dans ces séquences (tableau 12). On peut notamment citer la mutation « knock-down resistance » (kdr) induite par la présence de modifications ponctuelles d'acides aminés dans la séquence de la sous-unité α du canal Nav. Ces dernières confèrent aux insectes une sensibilité diminuée aux pyréthrinoïdes (Silva *et al.*, 2014). De plus, la mutation R81T (Arg81Thr) observée dans la sous-unité nicotinique $\beta 1$ a été plusieurs fois associée à la diminution de sensibilité des insectes aux néonicotinoïdes et/ou aux sulfoximines (Hirata *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017; Hirata *et al.*, 2017; Mezei *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2022). En effet, l'étude de la sensibilité de diverses souches de puceron *Myzus persicae* issues de culture permet d'illustrer cette affirmation. Dans ce cas, les souches qui ne possèdent pas la mutation R81T, présentent un rapport de résistance ou « Resistance ratio » (RR), c'est-à-dire le rapport entre les concentrations létales d'insecticides entraînant 50% de mortalité (CL_{50}) des souches résistantes et sensibles (ou de référence), allant jusqu'à 11,1 pour l'IMI et 6,0 pour le sulfoxaflor. En revanche, les souches qui présentent cette mutation ont un RR pouvant atteindre 986,1 pour l'IMI et 61,1 pour le sulfoxaflor (Mezei *et al.*, 2022).

Famille d'insecticides	Protéine cible mutée	Mutation	Espèce d'insecte résistant	RR Sensible vs Résistant	Réf
Pyréthroïde	Nav (mutation kdr)	L1014F/S (Leu1014Phe/Ser)	Genre anophèle		Silva <i>et al.</i> , 2014
		N1575Y (Asn1575Tyr)			
Carbamate	AChE1	G119S (Gly119Ser)	<i>Anopheles gambiae</i>		Elanga-Ndille <i>et al.</i> , 2019
Organophosphoré	AChE1	F392W (Phe392Trp)	<i>Bemisia tabaci</i> Souche B-Ref	<u>Chlorpyrifos</u> : 1 vs > 437	Alon <i>et al.</i> , 2008
	AChE1	G119S (Gly119Ser) F331C (Phe331Cys) I332L (Ile332Leu)	<i>Nilaparvata lugens</i> Souche R9	<u>Chlorpyrifos</u> : 1 vs > 253	Zhang <i>et al.</i> , 2017
Néonicotinoïde	β 1	R81T (Arg81Thr) V62I (Val62Ile) K264E (Lys264Glu)	<i>Aphis gossypii</i> Souche IMI-R	<u>IMI</u> : 1 vs > 1215 <u>ACET</u> : 1 vs > 1776	Chen <i>et al.</i> , 2017
	β 1	R81T (Arg81Thr) V101I (Val101Ile)	<i>Myzus persicae</i> Souche AH19-TI	<u>IMI</u> : 1 vs 45 <u>THIAM</u> : 1 vs 12 <u>DINO</u> : 1 vs 17	Xu <i>et al.</i> , 2022
	α 1 α 3	Y151S (Tyr151Ser)	<i>Nilaparvata lugens</i> Souche T35	<u>IMI</u> : 1 vs 250	Liu <i>et al.</i> , 2005
Spinosyne	α 6	G275E (Gly275Glu)	<i>Thrips palmi</i> Souche T5	<u>Spinosad</u> : 1 vs 1957	Bao <i>et al.</i> , 2014

Tableau 12 : Tableau non-exhaustif des mutations ponctuelles des protéines cibles identifiées chez des souches d'insectes résistantes aux insecticides. Si disponibles, les « Resistance Ratio » (RR) de ces souches sont indiqués. Les RR sont obtenus par le rapport entre les concentrations létales d'insecticides entraînant 50% de mortalité des souches résistantes et sensibles (ou de référence). ACET = acétamipride ; DINO = dinotéfurane ; IMI = imidaclopride ; THIAM = thiaméthoxame.

En plus des mutations ponctuelles des protéines cibles, des modifications d'expression de ces dernières ont également pu être associées aux phénomènes de résistances aux insecticides. L'analyse des profils d'expression des sous-unités nicotiniques par qPCR des souches de pucerons *Myzus persicae* AH19-TI (Xu *et al.*, 2022) et *Aphis gossypii* IMI-R (Chen *et al.*, 2017), qui sont résistantes à l'IMI, révèle une diminution d'expression de la sous-unité β 1. De plus, des modifications des profils d'expression des sous-unités nicotiniques chez d'autres souches d'insectes résistantes à l'IMI ont pu être documentées telles que la souche IM-R de puceron *Rhopalosiphum padi* qui présente une diminution d'expression des sous-unités nicotiniques α 1, α 2, α 3, α 7-1 et β 1 (Wang *et al.*, 2018) ainsi que la souche LC-2 de moucheron *Bradysia odoriphaga* qui présente, quant à elle, une diminution de l'expression des sous-unités nicotiniques Bo α 1, Bo α 2 et Bo β 1 ainsi qu'une augmentation des sous-unités Bo α 3 et Bo α 8 (Shan *et al.*, 2020). Dans ce dernier cas, l'utilisation de la technique d'ARNi dirigée contre les sous-unités Bo α 1 ou Bo β 1 a permis de rendre les insectes issus de la souche de référence, qui est naturellement plus sensible à l'IMI, moins sensibles à cet insecticide (Shan *et al.*, 2020). Enfin, cette technique a également permis de mimer la diminution d'expression de la sous-unité Nla8 d'une souche de cicadelle brune *Nilaparvata lugens* résistante à l'IMI et ainsi de valider l'implication de cette dernière dans la sensibilité de cet insecte à l'IMI (Zhang *et al.*, 2015b).

Pour conclure, il est important de noter que, dans ce manuscrit, les mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides tels que la résistance métabolique ou la modification des protéines cibles ont été présentés séparément mais, qu'en réalité, la diminution de la sensibilité aux insecticides peut résulter de la combinaison de ces mécanismes (Alon *et al.*, 2008; Bao *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2022).

4. Les phénomènes d'accommodation aux insecticides

4.1. Accommodation versus Résistance

Comme décrit précédemment dans ce chapitre, la résistance aux insecticides et les mécanismes sous-jacents sont bien documentés. En revanche, l'intérêt de la communauté scientifique envers les phénomènes d'accommodation aux insecticides semble plus récent. L'accommodation, au même titre que la résistance, induit une diminution de sensibilité à un traitement insecticide. Cependant, les mécanismes impliqués peuvent être différents. Par exemple, la mutation des protéines cibles des insecticides est un mécanisme prépondérant dans la résistance (Silva *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2022) mais à ce jour aucune modification du génome n'a été décrite chez des insectes accommodés (Rix et Cutler, 2018). De plus, les phénomènes d'accommodation apparaissent plus rapidement que la résistance. Ils surviennent au cours d'une même génération et peuvent ainsi diminuer la sensibilité à un insecticide plus précocement. En effet, une étude visant à évaluer la mise en place de mécanismes de résistance à l'IMI d'une souche de cicadelle brune *Nilaparvata lugens* en fonction des générations a démontré que, malgré une exposition à une dose d'IMI induisant en moyenne 1400 insectes morts sur 2000 à chaque génération, la sensibilité des insectes est faiblement impactée sur les sept premières générations (DL_{50} à F0 = 0,82 ng/insecte vs DL_{50} à F7 = 1,20 ng/insecte; Zewen *et al.*, 2003). En comparaison, des blattes *Periplaneta americana* accommodées après une exposition de 30 jours à une dose sublétales d'IMI présentent un taux de mortalité amoindri en réponse à une intoxication aiguë à cet insecticide comparé à celui des blattes contrôles (22% vs 55% de mortalité ; Bantz *et al.*, 2022). En ce sens, on pourrait définir l'accommodation à un insecticide comme le maintien de l'intégrité d'un insecte ou d'une population d'insecte, vis-à-vis d'une nouvelle exposition à un insecticide, par des modifications physiologiques, cellulaires et moléculaires rapidement mises en place après une première exposition à un tel composé. Ces modifications ont notamment été documentées chez des insectes exposés à une dose sublétales d'insecticide (Bantz *et al.*, 2018). Enfin, il est difficile de faire le lien entre accommodation et résistance aux insecticides mais la question d'hérédité des modifications observées chez les insectes après une exposition à une dose sublétales d'insecticide, notamment par des mécanismes épigénétiques, a pu être discutée (Brevik *et al.*, 2018).

4.2. Les doses sublétales d'insecticides

4.2.1. Définition et généralités sur les doses sublétales d'insecticides

Après l'application d'un traitement insecticide en champ, les insectes sont exposés à des doses variables d'insecticides pouvant aller d'une dose létale à une dose sublétales produite par la dégradation de ces composés dans l'environnement (Vryzas, 2018). La définition de dose sublétales varie dans la littérature. En

effet, la CL₅₀ a pu être considérée comme une dose sublétales (Qu *et al.*, 2022) tout comme une dose qui n'induit pas de mortalité (Benzidane *et al.*, 2017; Bantz *et al.*, 2022). Ainsi, dans ce manuscrit, une dose est considérée comme sublétales si elle suit la définition donnée par Nicolas Desneux : une dose est considérée comme sublétales si elle n'induit pas de mortalité significative dans une population expérimentale (Desneux *et al.*, 2007). A une dose sublétales, les insecticides peuvent induire des effets négatifs sur la physiologie des insectes mais également favoriser certaines fonctions biologiques, alors qu'à forte dose, ils ne présentent que des effets néfastes (Desneux *et al.*, 2007). Cette réponse biphasique dépendante de la dose d'insecticide est définie par le terme « hormèse » (Cutler et Guedes, 2017). En ce sens, l'implication des doses sublétales d'insecticides dans la survie et la sensibilité d'un insecte ou d'une population d'insecte aux insecticides a pu être étudiée (Bantz *et al.*, 2018). En effet, il a pu être rapporté, chez des insectes exposés à une dose sublétales d'insecticides, des modifications physiologiques, cellulaires et moléculaires telles que (figure 24) :

- des modifications des fonctions cognitives telles que la mémoire et l'apprentissage (Aliouane *et al.*, 2009; Goñalons et Farina, 2015) ;
- des modifications comportementales (ex : locomotion, reproduction ; Lalouette *et al.*, 2016; Jankowska *et al.*, 2023) ;
- des modifications épigénétiques (Brevik *et al.*, 2018) ;
- l'induction des enzymes de détoxification (Roat *et al.*, 2017) ;
- et des modifications transcriptionnelles (Shi *et al.*, 2017; Zoh *et al.*, 2022).

Dans cette partie, les modifications transcriptionnelles observées après une exposition à une dose sublétales d'insecticide seront discutées dans un premier temps. Puis, les travaux réalisés au laboratoire SiFCIR sur l'impact d'une dose sublétales d'IMI sur la blatte *Periplaneta americana* à l'échelle de la cellule et de l'organisme seront présentés.

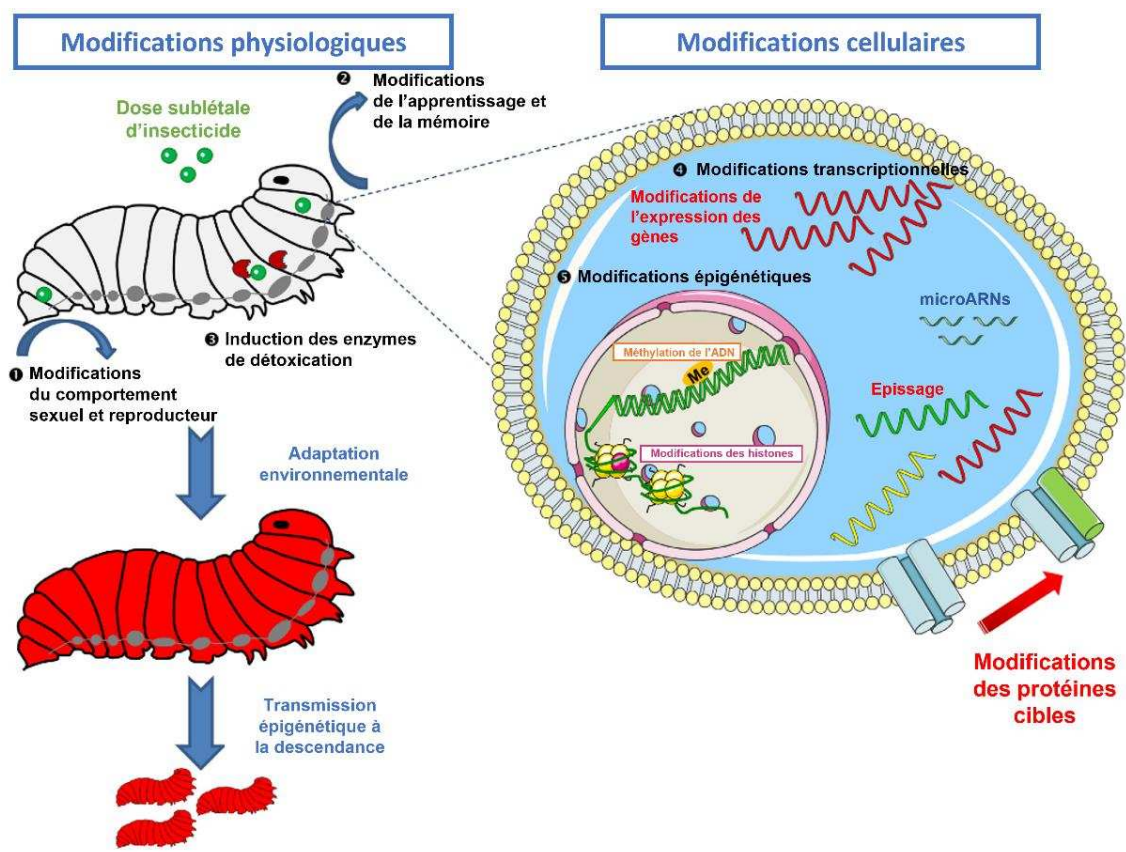


Figure 24 : Représentation schématique des phénomènes d'accommodation aux insecticides après une exposition à une dose sublétales d'insecticide et des principaux mécanismes sous-jacents. Modifiée d'après Bantz *et al.*, 2018.

4.2.2. Modifications transcriptionnelles après une exposition à une dose sublétales d'insecticide

A l'instar de la résistance aux insecticides, des modifications transcriptionnelles, notamment des enzymes de détoxification et des protéines cibles, ont pu être observées chez des insectes exposés à des doses sublétales d'insecticides par des approches transcriptomiques. En effet, l'analyse par RNAseq du transcriptome d'abeilles *Apis mellifera* adultes exposées à une dose sublétales de THIAM pendant dix jours consécutifs a révélé que 384 et 225 gènes étaient sous- et sur-exprimés respectivement. Parmi ces derniers, certains gènes qui codent pour des sous-unités nicotiniques sont impactés et une part importante des gènes différentiellement exprimés est impliquée dans le métabolisme et dans la machinerie cellulaire de la traduction. Notamment, les gènes qui codent pour les sous-unités nicotiniques divergentes Amel α 9 et Amel β 2 et le gène *Cyp6as5*, qui code pour une CYP450, sont surexprimés chez ces abeilles exposées (Shi *et al.*, 2017). Il est intéressant de souligner que la surexpression du gène *Cyp6as5* a pu être reliée auparavant à une diminution de la sensibilité de l'abeille adulte à un autre néonicotinoïde, le THI (Alptekin *et al.*, 2016). De la même manière, des gènes impliqués dans le métabolisme et la séquestration des insecticides ainsi que des gènes qui codent pour des protéines cuticulaires, pour les sous-unités nicotiniques Agama5, Agama6, Agama7 et Agam β 1 et pour l'AChE1 sont surexprimés chez des larves de moustique *Anopheles gambiae* après une exposition à une dose sublétales de l'insecticide formulé Fludora® Fusion. Ce dernier est composé d'un mélange de deltaméthrine et de CLO. De plus, des tests toxicologiques démontrent que les moustiques adultes, qui ont été exposés à une dose sublétales de l'insecticide formulé au stade larvaire, sont moins sensibles à ce dernier ainsi qu'à la CLO (Zoh *et al.*, 2022).

Bien que ces différentes études transcriptomiques avec une approche à priori aient rapporté des modifications d'expression des protéines cibles des insecticides, elles se sont principalement concentrées sur les modifications d'expression des enzymes de détoxification ainsi que des protéines capables de séquestrer les insecticides ou qui sont impliquées dans l'épaississement de la cuticule. Quant à l'implication des protéines cibles dans les phénomènes d'accommodation aux insecticides engendrés par une exposition à une dose sub létale d'insecticide, elle reste en comparaison, encore peu documentée. Dans ce cadre, Verena Christen et ses collaborateurs se sont intéressés aux modifications d'expression des sous-unités nicotiques Amela1 et Amela2 dans le cerveau d'abeille *Apis mellifera* après une exposition à une dose sub létale de divers néonicotinoïdes. Ainsi, ils ont démontré, par qPCR, que la sous-unité Amela1 est surexprimée chez des abeilles exposées à l'ACET, la CLO, l'IMI et le THIAM alors que Amela2 est surexprimée seulement après une exposition à l'IMI et au THIAM (Christen *et al.*, 2016). Malgré tout, peu d'études se sont intéressées à l'implication des modifications d'expression des sous-unités nicotiques dans les phénomènes d'accommodation aux insecticides.

4.2.3. Les mécanismes d'accommodation à l'imidaclopride mis en place par la blatte *Periplaneta americana* après une exposition à une dose sub létale de cet insecticide

Au laboratoire SiFCIR, les modifications physiologiques et cellulaires ainsi que l'implication des nAChRs dans l'accommodation à l'IMI de la blatte *Periplaneta americana* après une exposition à une dose sub létale de cet insecticide ont été étudiées. Des tests toxicologiques réalisés sur ces blattes exposées pendant 30 jours ont permis de démontrer qu'elles présentent une sensibilité amoindrie à l'IMI. De plus, cette diminution de sensibilité est maintenue pendant au moins 30 jours supplémentaires durant lesquels les blattes ne sont plus exposées à l'IMI (Bantz *et al.*, 2022). Ainsi, ces blattes peuvent être considérées comme accommodées à cet insecticide. De plus, des expériences de qPCR à partir des ARNs totaux extraits des derniers ganglions abdominaux (DGA) de ces blattes accommodées ont permis d'établir un profil d'expression des sous-unités nicotiques. Dans ce cas, les sous-unités nicotiques Pamea1 et Pamea2 qui composent, avec Pameβ1, le nAChR2 sont sur- et sous-exprimées respectivement alors qu'aucune modification d'expression des sous-unités qui composent le nAChR1, à savoir Pama3, Pama8 et Pameβ1, n'a été rapportée (Benzidane *et al.*, 2017). De plus, la mesure des courants ioniques induits par l'application d'IMI, qui active uniquement les nAChR1, en présence d' α -bgt sur une gamme de potentiel allant de -10 à -70mV sur des neurones DUM issus de blattes accommodées démontre que, dans ce cas, ce sous-type de récepteur présente une sensibilité diminuée à l'insecticide. Les auteurs ont également suggéré que la fonctionnalité du nAChR2 est favorisée par rapport au nAChR1 chez ces mêmes blattes car le blocage de ce dernier par la d-tubocurarine ne modifie pas l'amplitude maximale du courant ionique mesuré suite à l'application de NIC contrairement aux blattes naïves (Benzidane *et al.*, 2017). Ainsi, les auteurs ont suggéré l'implication des nAChR1 et nAChR2 dans l'accommodation à l'IMI des blattes exposées à une dose sub létale de cet insecticide. En ce sens, il a également pu être démontré que la diminution d'expression de la sous-unité Pamea2 par la technique d'ARNi conduit à une diminution de la sensibilité des blattes naïves à l'IMI favorisant ainsi l'hypothèse de l'implication des nAChR2 dans cet exemple d'accommodation à un insecticide (Bantz *et al.*, 2022).

Chapitre 3 : L'interférence ARN chez l'insecte

1. Découverte et généralités sur l'interférence ARN

Depuis la découverte de l'ARN messager (ARNm) dans les années 1960 par Jacques Monod et François Jacob (Jacob et Monod, 1961), ce qui leur a valu le prix Nobel de physiologie ou de médecine en 1965, les ARNs étaient uniquement considérés comme des macromolécules inertes qui avaient pour unique rôle de soutenir la machinerie de synthèse des protéines. Ce n'est que dans les années 1980, que des travaux réalisés chez la bactérie *Escherichia coli* ont pu mettre en évidence l'existence d'ARNs antisens capables d'inhiber la réplication des plasmides (Stougaard *et al.*, 1981; Tomizawa *et al.*, 1981). Ces expériences ont eu un impact majeur car elles ont été les premières à prêter une fonction régulatrice aux ARNs. Quant au concept même d'interférence ARN (ARNi), il a été observé par hasard pour la première fois en 1990 par Richard Jorgensen et ses collaborateurs (Napoli *et al.*, 1990). C'est en voulant intensifier la coloration mauve des pétales d'une espèce de pétunia (*Petunia hybrida*) en introduisant par transgénèse de multiples copies du gène de la chalcone synthase, l'enzyme responsable de la biogénèse du pigment anthocyanine, que les chercheurs ont observé un effet surprenant : 40% des pétunias obtenus étaient partiellement ou totalement blancs. L'insertion de multiples copies du gène de la chalcone synthase semblait avoir engendré une extinction partielle ou totale des gènes endogènes et exogènes qui codent pour cette enzyme. C'est ce qu'ils avaient appelé la « co-suppression ». Bien que Jorgensen et ses collaborateurs avaient déjà émis l'hypothèse d'une régulation de l'expression des gènes aux niveaux transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel, ce n'est qu'en 1998 que Andrew Fire, Craig Mello et leurs collaborateurs observent et décrivent l'ARNi grâce à leurs études sur le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998). En effet, l'introduction expérimentale d'ARNs double brin (dsRNAs pour « double-stranded RNA ») correspondant à unc-22, une protéine de myofilament, a permis d'éteindre le gène qui code pour cette protéine. Ils venaient d'identifier l'une des trois voies d'ARNi que l'on connaît aujourd'hui. Cette découverte était révolutionnaire et a engendré des décennies de projet de recherche fondamentale. C'est pourquoi Andrew Fire et Craig Mello ont été récompensés par le prix Nobel de physiologie ou de médecine en 2006.

Aujourd'hui, on peut définir l'ARNi comme un ensemble de mécanismes cellulaires hautement conservés dans lesquels de petits ARNs non-codants vont induire la dégradation d'ARNs cibles plus longs grâce à la complémentarité de séquence entre ces ARNs. De ce fait, l'ARNi est un mécanisme de régulation post-transcriptionnel de l'expression des gènes. Les protéines de la famille Dicer (Dcr) et Argonaute (Ago) présentent un rôle majeur dans les trois voies d'ARNi identifiées aujourd'hui. En effet, chez les insectes et les autres animaux, 3 différentes classes de petits ARNs capables de déclencher 3 voies distinctes d'ARNi ont été décrites (Zhou *et al.*, 2008). Ces classes de petits ARNs comprennent les ARNs interférents courts/petits ou siRNAs (pour « short interfering RNA ») qui interviennent dans la voie des siRNAs, les microARNs ou miRNAs qui interviennent dans la voie des miRNAs et les ARNs interagissant avec Piwi (pour « P-element Induced WImpy testis ») ou piRNAs (pour « PIWI-associated RNA ») qui interviennent dans la voie des piRNAs (figure 25 ; Meister, 2013; Nandety *et al.*, 2014). La voie des siRNAs est principalement responsable de la réponse antivirale chez les insectes mais également de la protection du génome contre les rétrotransposons au sein des cellules somatiques. La voie des miRNAs est principalement impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. La voie des piRNAs, quant à elle, est responsable de la dégradation des rétrotransposons dans les

cellules germinales (Zhu et Palli, 2020). L'ARNi a pu être observée dans tous les organismes eucaryotes, y compris les protozoaires, les invertébrés, les vertébrés, les champignons, les algues et les plantes (Agrawal *et al.*, 2003). Depuis sa découverte, la technique d'ARNi a été utilisée comme puissant outil d'étude génétique de l'expression, de la régulation et de l'interaction des gènes, tant à l'échelle de la cellule qu'à celle de l'organisme (Nandety *et al.*, 2014; Ben-Amar *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2017) et, aujourd'hui, elle présente un grand potentiel dans la lutte contre les insectes ravageurs (Baum *et al.*, 2007; Price et Gatehouse, 2008; Rosa *et al.*, 2018; Niu *et al.*, 2019; Qiao *et al.*, 2022; Qu *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022). Dans ce chapitre, nous décrivons dans un premier temps la voie des siRNAs puis les facteurs modulant l'efficacité des dsRNAs chez l'insecte. Enfin, la place actuelle de l'ARNi dans la lutte contre les insectes sera discutée.

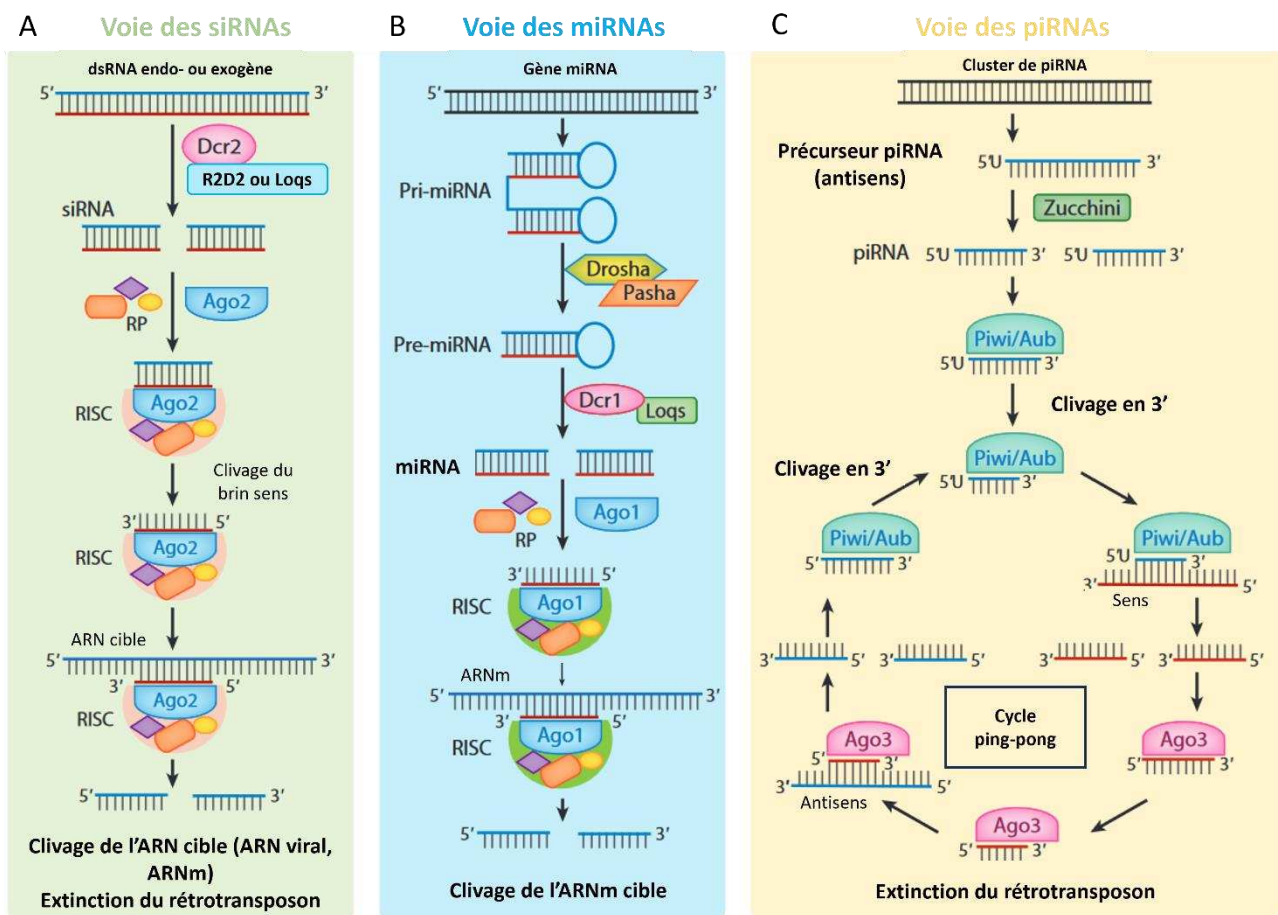


Figure 25 : Représentation schématique des différents voies d'interférence ARN chez l'insecte: (A) la voie des siRNAs, (B) la voie des miRNAs et (C) la voie des piRNAs. Aub = aubergine ; Ago = argonaute ; Dcr = dicer ; dsRNA = « double-stranded RNA » ; Loqs = « Loquacious » ; miRNA = « microRNA » ; piRNA = « PIWI-associated RNA » ; RP = « RISC-associated protein » ; siRNA = « short-interfering RNA ». Modifiée d'après Zhu et Palli, 2020.

2. La voie des siRNAs

2.1. Absorption cellulaire des dsRNAs exogènes et interférence ARN systémique

Dans cette voie d'ARNi, la dégradation d'un ARN cible est dépendante de la présence d'un siRNA complémentaire. Contrairement aux deux autres voies, la voie des siRNAs fait intervenir des dsRNAs endogènes ou exogènes pour la production de ces siRNAs. Les dsRNAs endogènes peuvent dériver d'éléments répétés ou transposables du génome (Czech *et al.*, 2008; Ghildiyal *et al.*, 2008; Biryukova et Ye, 2015). Les dsRNAs exogènes (ou environnementaux), quant à eux, peuvent être d'origine virale ou introduits expérimentalement (Carthew et Sontheimer, 2009). L'origine exogène de certains dsRNAs suggère l'existence de mécanismes ou de transporteurs permettant l'internalisation cellulaire de ces ARNs. Le premier mécanisme d'absorption cellulaire des dsRNAs a pu être décrit chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ce dernier s'appuie sur le transport passif des dsRNAs par une famille de protéines transmembranaires SID (pour « Systemic RNA interference defective » ; Rocheleau, 2012). Chez ce nématode, SID-2 est exprimée au niveau intestinal et est supposée être impliquée dans l'absorption des dsRNAs exogènes par endocytose (Winston *et al.*, 2007; McEwan *et al.*, 2012). Cependant, aucun gène homologue au gène *Sid-2* de *Caenorhabditis elegans* n'a été identifié chez les insectes (Tomoyasu *et al.*, 2008; Joga *et al.*, 2016). De plus, l'expression du gène *Sid-2* du nématode dans des cellules BmN4 de papillon *Bombyx mori* ne permet pas le déclenchement de la voie des siRNA lorsque des dsRNAs sont présents dans le milieu de culture (Kobayashi *et al.*, 2012). Ainsi, SID-2 ne semble pas impliquée dans l'absorption cellulaire des dsRNAs exogènes chez l'insecte.

Chez le nématode, il a été découvert une autre protéine SID, SID-1, qui est une protéine canal impliquée dans l'internalisation des dsRNAs exogènes ainsi que dans le transport intercellulaire de ces derniers et des siRNAs (Winston *et al.*, 2002; Feinberg et Hunter, 2003; Shih et Hunter, 2011; Li *et al.*, 2015b). Aucun gène orthologue au gène *Sid-1* du nématode n'a été identifié chez l'insecte. En revanche, des gènes « *Sid-1-like* » appelés *Sil1* ont été identifiés chez différentes espèces d'insectes (Xu et Han, 2008; Wang *et al.*, 2014; Cappelle *et al.*, 2016). Cependant, l'analyse phylogénétique plus approfondie de ces gènes *Sil1* chez le scarabée *Tribolium castaneum* suggère que leur séquence protéique semble plus proche des protéines TAG-130 et CHUP-1 du nématode (Tomoyasu *et al.*, 2008; Vélez et Fishilevich, 2018). Par la suite, il a été démontré que CHUP-1 est impliquée dans le transport du cholestérol chez *Caenorhabditis elegans* (Valdes *et al.*, 2012). En revanche, la fonction de TAG-130 reste encore à élucider. Malgré tout, l'implication de certains gènes *Sil1* dans l'absorption cellulaire des dsRNAs exogènes a pu être rapportée, notamment par une approche « RNAi-of-RNAi », chez la cicadelle brune *Nilaparvata lugens* (Xu *et al.*, 2013), la chrysomèle *Diabrotica virgifera virgifera* (Miyata *et al.*, 2014), le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* (Cappelle *et al.*, 2016) et le puceron *Acyrtosiphon pisum* (Ye *et al.*, 2022). L'approche « RNAi-of-RNAi » consiste en l'utilisation d'un premier ARN interférent dirigé contre un gène potentiellement impliqué dans le mécanisme d'ARNi ou dans l'absorption cellulaire des dsRNAs suivie de l'application d'un second ARN interférent dit « rapporteur » qui cible, quant à lui, un second gène qui n'est pas impliqué dans ces mécanismes. Ainsi, la mesure d'expression du gène « rapporteur », notamment par qPCR, permet d'évaluer l'implication du premier gène cible dans le mécanisme d'ARNi ou dans l'absorption cellulaire des ARN interférents. Le nombre de gène *Sil1* est variable chez les insectes mais la majorité en présente au moins un. La mouche *Drosophila melanogaster*, quant à elle, ne

présente pas de gène *Sil1* dans son génome suggérant l'existence d'autres mécanismes impliqués dans l'absorption cellulaire des dsRNAs exogènes (Joga *et al.*, 2016). En ce sens, l'endocytose dépendante de la clathrine des dsRNAs exogènes a pu être étudiée, également par une approche « RNAi-of-RNAi », dans l'absorption cellulaire de ces derniers. L'implication d'un tel mécanisme a pu être rapportée dans les cellules S2 de la drosophile *Drosophila melanogaster* (Uvila *et al.*, 2006) mais également chez le puceron *Acyrtosiphon pisum* (Ye *et al.*, 2021) et le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* (Cappelle *et al.*, 2016). Ainsi, selon les espèces d'insecte, l'absorption cellulaire des dsRNAs exogènes semble se produire soit par transport à travers la membrane cellulaire par des protéines canal SID-1-like, soit par endocytose ou les deux (figure 26).

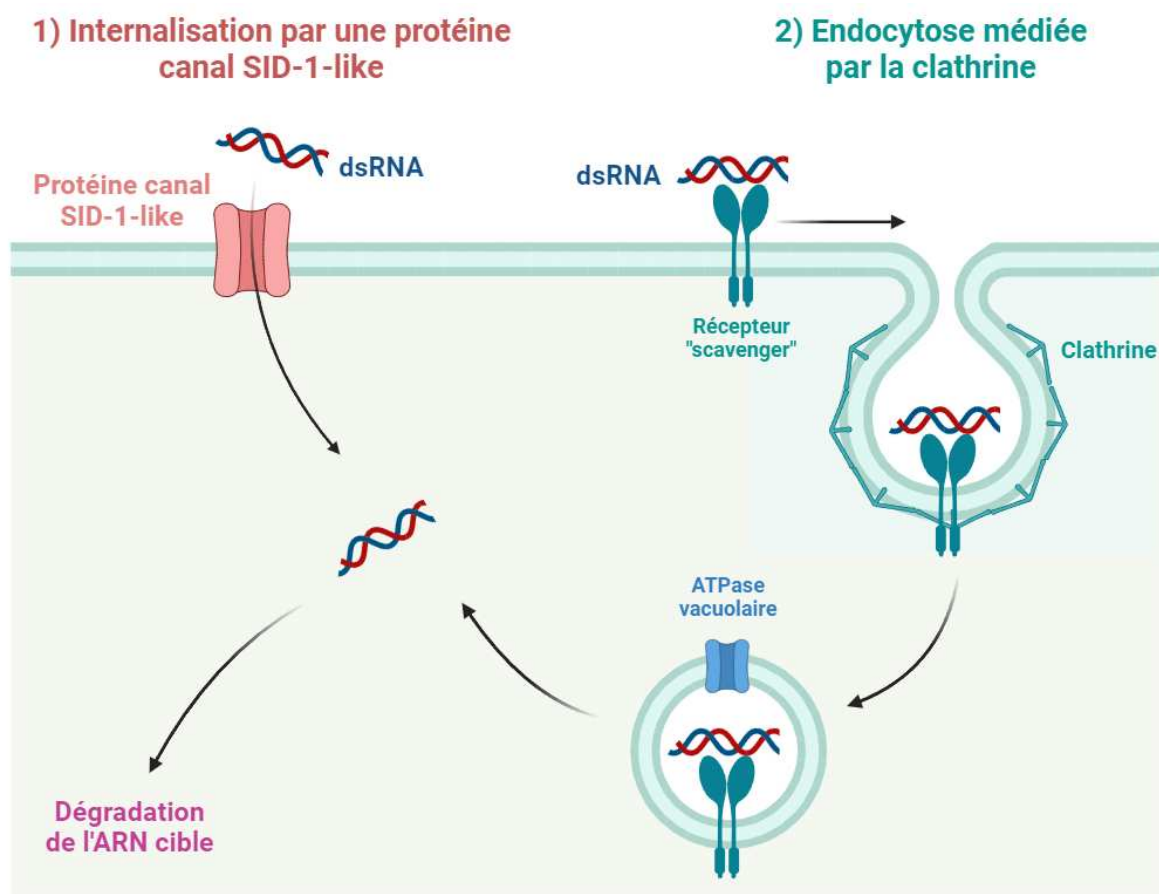


Figure 26 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans l'absorption cellulaire des dsRNAs exogènes chez l'insecte. Le premier mécanisme est l'internalisation des dsRNAs par une protéine canal SID-1-like. Le second correspond à l'endocytose médiée par la clathrine. Dans ce dernier, le dsRNA exogène va interagir avec un récepteur « scavenger » (ou éboueur) dans un premier temps. Puis, ce complexe sera internalisé par endocytose médiée par la clathrine. Enfin, l'acidification de l'endosome nouvellement formé, notamment par les ATPases vacuolaires, va permettre la libération du dsRNA dans le cytoplasme. dsRNA = « Double-stranded RNA » ou ARN double brin.

Comme décrit précédemment, chez *Caenorhabditis elegans*, SID-1 est également impliquée dans le transport intercellulaire des dsRNAs et siRNAs (Winston *et al.*, 2002; Shih et Hunter, 2011; Li *et al.*, 2015b). De ce fait, cette protéine possède un rôle majeur dans la systématisation de l'ARNi chez le nématode. L'ARNi systémique peut être définie comme un mécanisme par lequel l'application locale de dsRNAs conduit à une

réponse d'ARNi dans tout l'organisme (Zhu et Palli, 2020). Des réponses systémiques de l'ARNi ont pu être observées chez diverses espèces d'insectes (Bolognesi *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2012; Wynant *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013; Ivashuta *et al.*, 2015; Bantz *et al.*, 2022) mais les mécanismes sous-jacents permettant la diffusion des dsRNAs ou siRNAs restent encore inconnus. Enfin, chez les nématodes et les plantes, la systématisation de cette réponse est également permise par une amplification intracellulaire des siRNAs, on parle dans ce cas d'ARNi « transitive ». Ces siRNAs secondaires sont produits par une ARN polymérase dépendante de l'ARN (ou RdRP pour « RNA-dependant RNA Polymerase ») à partir de l'ARN cible. En revanche, aucun homologue des RdRPs n'est présent dans les génomes d'insectes (Gordon et Waterhouse, 2007) et aucun siRNA secondaire ne semble être produit en réponse à un dsRNA exogène (Li *et al.*, 2018a).

2.2. Mécanismes moléculaires responsables de la dégradation de l'ARN cible

Une fois internalisés, les dsRNAs vont aboutir à la dégradation de l'ARN cible. Dans le cas d'un dsRNA exogène, l'ARN cible pourra correspondre à un ARN viral ou à un ARNm défini expérimentalement comme cible. Les étapes effectrices de la dégradation d'un ARN par la voie des siRNAs sont médiées selon un mode commun chez les plantes, les vertébrés et les invertébrés (Ghildiyal et Zamore, 2009). Ces étapes sont i) le clivage d'un dsRNA en siRNA double brin par une enzyme Dcr et ii) la dégradation du brin sens ou « passager » du siRNA et de l'ARN cible complémentaire au brin antisens ou « guide » par Ago au sein d'un complexe protéique RISC (« RNA-induced silencing complex »).

2.2.1. Clivage des dsRNAs en siRNAs par Dicer

Les insectes, contrairement aux vertébrés et à certains invertébrés, possèdent deux enzymes Dcr (Lee *et al.*, 2004; Tomoyasu *et al.*, 2008). Le clivage des dsRNAs en siRNAs d'environ 19 à 21 pb fait intervenir une RNase de type III de cette famille, Dcr2. Les premières données structurales sur l'interaction Dcr/dsRNA et le clivage de ce dernier ont été obtenues à partir de structures cristallisées issues de *Giardia intestinalis*, un protozoaire flagellé (MacRae *et al.*, 2006). A partir de ces données, un modèle structurel de Dcr a pu être proposé pour l'Homme (Zhang *et al.*, 2004) et, par la suite, pour Dcr2 de la mouche *Drosophila melanogaster* (Dm-Dcr2 ; Wynant *et al.*, 2014). Dm-Dcr2, tout comme l'enzyme Dcr des vertébrés et certains invertébrés, présente différents domaines impliqués dans l'interaction avec le dsRNA d'intérêt et dans le clivage de ce dernier en siRNAs double brin (figure 27). Ces domaines sont les suivants (de l'extrémité N-terminale à C-terminale) :

- Deux domaines hélicase qui seraient impliqués dans la sélection des dsRNAs selon leur extrémité (Welker *et al.*, 2011). Dm-Dcr1, qui est impliqué dans la maturation des miRNAs, n'en possède qu'un seul (Lee *et al.*, 2004).
- Un premier domaine atypique capable de fixer le dsRNA (ou dsRBD pour « dsRNA-binding domain ») aussi appelé DUF 283 (« Domain of Unknown Function ») dont la fonction n'est pas encore bien définie (Kurzynska-Kokorniak *et al.*, 2016).

- Un domaine PAZ (« Piwi/Argonaute/Zwille ») considéré comme incomplet car il est plus court que le domaine PAZ de Dm-Dcr1 qui est impliqué dans la voie des miRNAs (Tomoyasu *et al.*, 2008). Le domaine PAZ permet de stabiliser l'extrémité d'un dsRNA au niveau d'une poche capable de fixer les phosphates. Il serait impliqué dans le maintien de la taille relativement constante des siRNAs produits (Kandasamy et Fukunaga, 2016).
- Deux domaines RNase III disposés en tandem (RNase IIIa et RNase IIIb) qui sont responsables du clivage du dsRNA à proprement parlé. Chaque domaine RNase III cliverait un des deux brins du dsRNA (Wynant *et al.*, 2014).
- Un second domaine dsRBD qui a pour fonction de stabiliser le dsRNA (Zhang *et al.*, 2004).

Bien que les RNases III possèdent un domaine capable de fixer le dsRNA (domaine DUF 283), ces enzymes requièrent aussi des protéines capables de fixer un dsRNA (ou dsRBP pour « dsRNA-binding protein »). Ici, Dcr2 peut s'associer avec deux dsRBPs différentes : Loquacious (Loqs) et R2D2. Il est communément admis que ces dsRBPs sont impliquées dans la voie des siRNAs induite par un dsRNA endogène et exogène respectivement. Cependant, il a pu être suggéré que R2D2 et Loqs peuvent intervenir dans une voie de siRNA commune (Marques *et al.*, 2010). Enfin, il a été démontré que leurs fonctions ne sont pas redondantes lors de l'injection d'un dsRNA exogène dans des embryons de mouche *Drosophila melanogaster* qui portent des mutations de Loqs ou R2D2. En effet, Loqs participerait au clivage du dsRNA en siRNAs et R2D2 dans le chargement des siRNAs produits au sein du complexe RISC qui est responsable de la dégradation de l'ARN cible (Marques *et al.*, 2010).

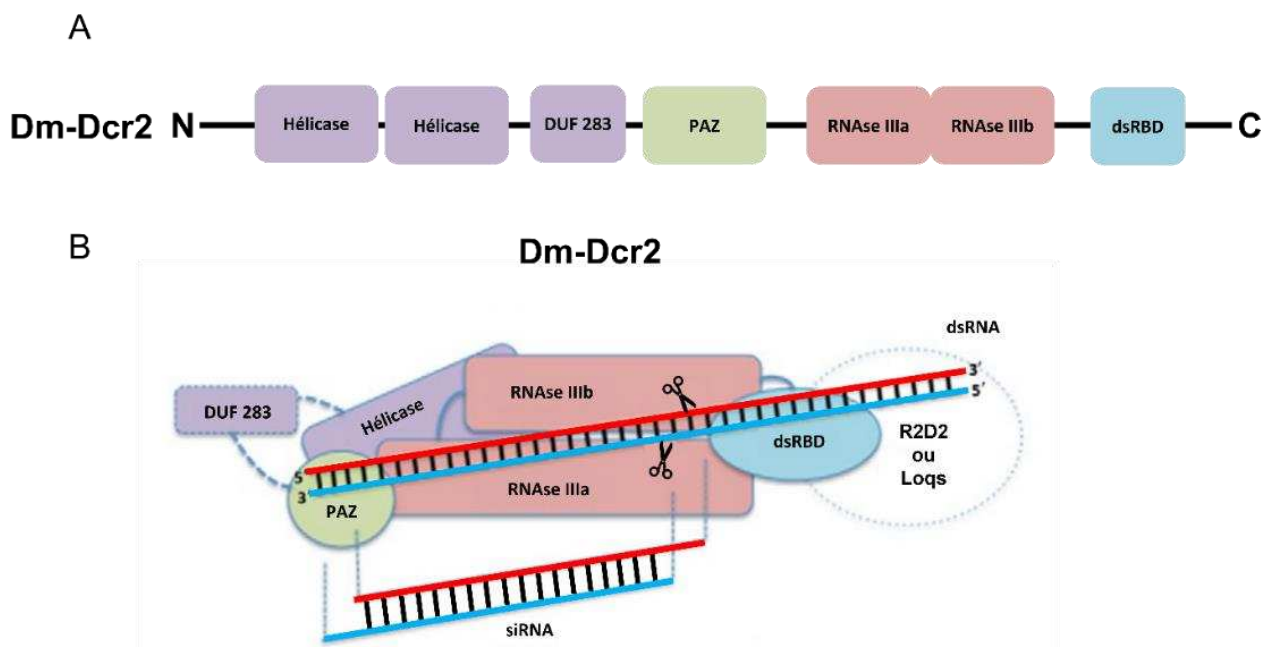


Figure 27 : Structure de l'enzyme Dicer 2 de la mouche *Drosophila melanogaster* (Dm-Dcr2). (A) Représentation schématique de l'organisation des domaines de Dm-Dcr2. (B) Représentation schématique de l'agencement des domaines de Dm-Dcr2 autour d'un dsRNA. dsRBD = « dsRNA-binding domain » ; dsRNA = « double-stranded RNA » ; siRNA = « short-interfering RNA ». Modifiée d'après Wynant *et al.*, 2014.

2.2.2. Dégradation de l'ARN cible par Argonaute

La dégradation de l'ARN cible est réalisée par le complexe RISC. Ce dernier est composé d'une enzyme Ago, de protéines associées à RISC (RP pour « RISC-associated protein ») et du brin guide du siRNA qui est complémentaire à l'ARN cible. Le nombre de gènes *ago* qui codent pour les protéines Ago est variable selon les insectes. Chez les insectes, les protéines Ago sont divisées en deux familles : les Ago (Ago1 et Ago2) et les PIWI (PIWI, Aubergine, Ago3). Chez la mouche *Drosophila melanogaster*, cinq gènes *ago* et cinq protéines associées ont été identifiés : Dm-Ago1, Dm-Ago2, Dm-Ago3, Dm-PIWI et Dm-Aubergine (Carthew et Sontheimer, 2009). Ago2 présente une activité ribonucléasique et est directement responsable du clivage de l'ARN cible. Plus précisément, le complexe Dcr2/R2D2 va induire l'assemblage d'un complexe pré-RISC par l'ajout de Ago2 et de protéines RP. Ce complexe pré-RISC contient également le siRNA double brin obtenu par le clivage d'un dsRNA (Carthew et Sontheimer, 2009). Il a pu être démontré, par l'utilisation de brins passager radiomarqués et par la mesure de la radioactivité à différents temps lors de l'assemblage du complexe RISC *in vitro*, que le brin passager du siRNA est dégradé et éliminé par Ago2, de la même manière que l'ARN cible, lors de l'assemblage et l'activation de RISC de telle sorte à ne conserver que le brin guide (Matranga *et al.*, 2005; Rand *et al.*, 2005). Ainsi, un complexe RISC fonctionnel est obtenu. En ce sens, Ago2 est l'enzyme clé dans l'étape fonctionnelle de dégradation de l'ARN cible. Tout comme pour Dm-Dcr2 décrit précédemment, un modèle structural de l'interaction et du clivage de l'ARN cible par Dm-Ago2 de *Drosophila melanogaster* a pu être proposé (figure 28 ; Wynant *et al.*, 2014). Dm-Ago2 présente quatre domaines fonctionnels (de l'extrémité N-terminale à C-terminale) :

- Un domaine N-terminal qui serait indispensable à l'ouverture du siRNA double brin lors de l'assemblage de RISC et de la molécule d'ARN intermédiaire double brin (brin guide/ARN cible) formée lors de l'étape de clivage de l'ARN cible (Kwak et Tomari, 2012) ;
- Un domaine PAZ qui lie l'extrémité 3' du brin guide du siRNA (Kandeel *et al.*, 2014),
- Un domaine Mid (Middle) qui fixe, quant à lui, l'extrémité 5' du brin guide (Faehnle et Joshua-Tor, 2010).
- Un domaine PIWI structurellement similaire à une ribonucléase H et qui est responsable du clivage de l'ARN cible (Meister, 2013).

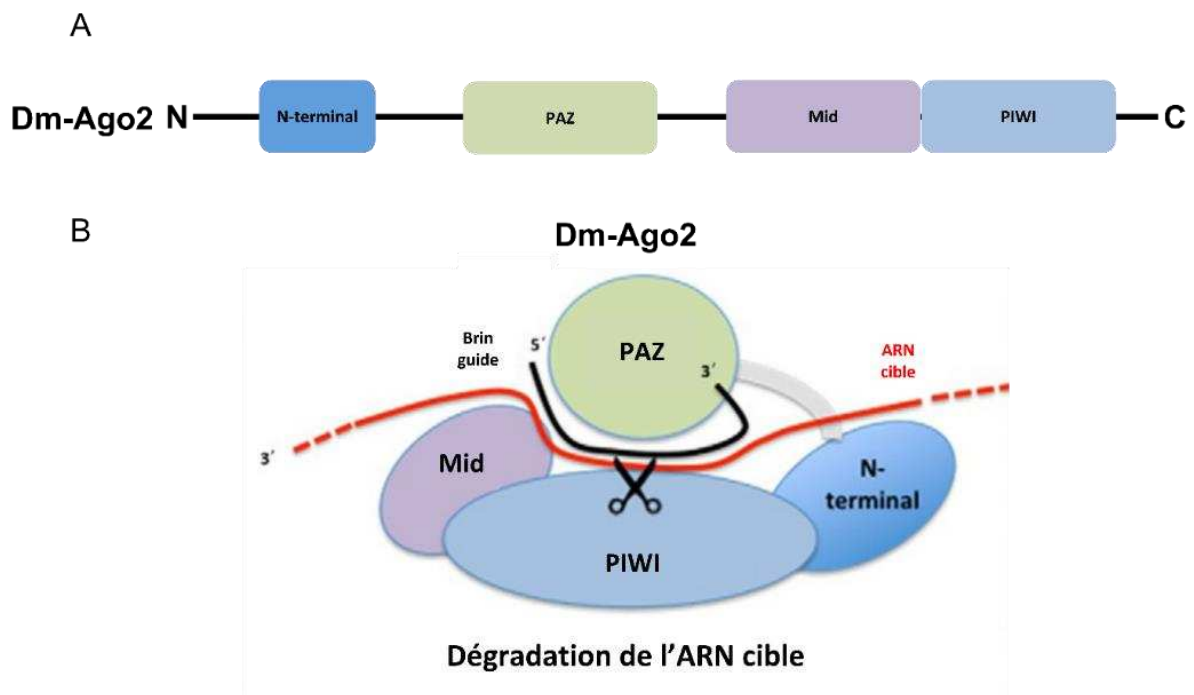


Figure 28 : Structure de l'enzyme Argonaute 2 de la mouche *Drosophila melanogaster* (Dm-Ago2). (A) Représentation schématique de l'organisation des domaines de Dm-Ago2. (B) Représentation schématique de l'agencement des domaines de Dm-Ago2 autour d'un dsRNA. Modifiée d'après Wynant *et al.*, 2014.

2.3. Principaux rôles physiologiques de la voie des siRNAs

2.3.1. Implication dans la réponse antivirale de l'insecte

Parmi les trois voies d'ARNi identifiées, la voie des siRNAs est principalement responsable de la réponse antivirale chez les insectes (Kingsolver *et al.*, 2013; Tafesh-Edwards et Eleftherianos, 2020). La mouche *Drosophila melanogaster* est un modèle d'étude pour comprendre les infections virales ainsi que les mécanismes antiviraux (Xu et Cherry, 2014). Il a notamment été montré que des souches de drosophiles mutées sur les gènes qui codent pour Dm-Dcr2 ou Dm-Ago2 présentent un phénotype particulier que les auteurs ont décrit comme étant un « enhanced disease phenotype » qui se caractérise par une réplication virale plus importante et une mortalité accrue après une infection par le virus « Flock House », le « Drosophila C virus » ou le « Cricket paralysis virus » (Galiana-Arnoux *et al.*, 2006; van Rij *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). De plus, chez la drosophile, des siRNAs viraux sont produits par la dégradation de dsRNAs viraux qui correspondent à des intermédiaires dans le cycle de réplication de virus à ARN et à ADN, ce qui confirme une large activité antivirale de cette voie (Leggewie et Schnettler, 2018). En effet, différentes études réalisées sur cet insecte ont pu montrer l'implication de la voie des siRNAs dans les mécanismes antiviraux après une infection par des virus de la famille des *Dicistroviridae*, *Nodaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, *Bunyavirus*, *Flaviviridae* qui possèdent un génome composé d'un ARN simple brin ; de la famille des *Birnaviridae* qui ont un génome composé d'un ARN double brin et de la famille des *Iridoviridae*, qui quant à elle est composée de virus à ADN double brin (Xu et Cherry, 2014). D'autres études ont également permis de montrer le rôle de la voie des siRNAs comme mécanisme antiviral chez d'autres insectes comme les moustiques *Aedes aegypti* et

Anopheles gambiae (Keene *et al.*, 2004; Sánchez-Vargas *et al.*, 2009; McFarlane *et al.*, 2014), l'abeille *Apis mellifera* (Chejanovsky *et al.*, 2014) ou encore la papillon *Bombyx mori* (Zografidis *et al.*, 2015).

2.3.2. Rôle dans la protection du génome

Les éléments transposables du génome sont des séquences d'ADN capables de se déplacer et de s'insérer de manière autonome au sein du génome par un mécanisme appelé transposition. Ces éléments sont une part importante des génomes. En effet, ils correspondent à environ 45% du génome humain (Lander *et al.*, 2001) et 20% du génome de la mouche *Drosophila melanogaster* (Kapitonov et Jurka, 2003). Certains de ces éléments transposables, appelés rétrotransposons, nécessitent un intermédiaire ARN pour se déplacer. Ces rétrotransposons peuvent induire une instabilité génomique notamment par mutagenèse par insertion (Hyun, 2017). Chez les insectes, la dégradation des intermédiaires ARN des rétrotransposons a majoritairement été attribuée à la voie des piRNAs (Siomi *et al.*, 2011; Hyun, 2017; Ninova *et al.*, 2017; Sato et Siomi, 2020). Cependant, l'implication de la voie des siRNAs dans leur clivage a également été suggérée. En effet, il a été rapporté, dans des têtes de drosophiles, la présence de siRNAs correspondants à des éléments transposables du génome. De plus, dans des souches de drosophiles mutées sur Dm-Dcr2 ou Dm-Ago2, l'expression de certains rétrotransposons est augmentée (Ghildiyal *et al.*, 2008).

Ainsi, l'ARNi constitue une véritable barrière défensive contre des « agressions » d'origines endogène et exogène. C'est cette capacité à répondre à l'ajout d'un ARN interférent exogène qui a permis d'envisager l'utilisation de l'ARNi pour lutter contre les insectes nuisibles.

3. Stratégies favorisant l'efficacité de l'interférence ARN chez l'insecte

L'efficacité de l'ARNi en réponse à un dsRNA exogène est variable selon les espèces d'insectes. Divers facteurs ont pu être associés à ces différences tels que le mode d'application (micro-injection, topique, ingestion), l'absorption cellulaire des dsRNAs difficile, une systématisation de la réponse impossible, des différences au niveau des protéines Ago ou encore un manque de stabilité des dsRNAs dans l'environnement dans lequel évolue l'insecte cible et la présence d'endonucléases dans leur tractus digestif (Zhu et Palli, 2020). L'un des enjeux dans l'utilisation de la technique d'ARNi pour lutter contre les insectes nuisibles est le développement de stratégies permettant d'augmenter leur efficacité au sein des espèces cibles. Parmi ces stratégies, le choix de la méthode d'application, l'encapsulation des dsRNAs et la prise en compte de certains paramètres moléculaires lors de leur conception ont notamment pu être rapportés.

3.1. Modes d'application

3.1.1. La micro-injection

La méthode la plus couramment utilisée pour l'administration de dsRNAs est la micro-injection, dans laquelle une petite quantité de dsRNAs est directement injectée dans un embryon d'insecte ou dans le corps

d'un insecte. Cette méthode d'application a montré des résultats probants en terme d'efficacité chez diverses espèces d'insectes (Kennerdell et Carthew, 1998; Martín *et al.*, 2006; Tomoyasu *et al.*, 2008; Huang et Lee, 2011; Lu *et al.*, 2012b; Li *et al.*, 2015a; Yu *et al.*, 2016). Les avantages principaux de cette méthode d'application sont de pouvoir contrôler la dose de dsRNAs injectée ainsi que de cibler une zone. En ce sens, elle permet d'obtenir une réponse d'ARNi efficace même chez des insectes dépourvus de mécanisme de systématisation de cette réponse comme la mouche *Drosophila melanogaster*. En revanche, bien que la micro-injection convienne pour l'analyse fonctionnelle de gènes, elle est difficilement envisageable pour contrôler une population d'insectes nuisibles à grande échelle (Yan *et al.*, 2021).

3.1.2. L'application topique

Un traitement par application topique de dsRNAs suggère leur absorption au niveau de la cuticule de l'insecte. Cette méthode s'est également avérée efficace, par application directe sur la cuticule avec une micro-pipette ou avec un spray, chez diverses espèces d'insectes (El-Shesheny *et al.*, 2013; Gong *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015a; San Miguel et Scott, 2016; Dias *et al.*, 2019; Niu *et al.*, 2019). Contrairement à la micro-injection, traiter les insectes avec des dsRNAs par application topique semble plus envisageable à grande échelle.

3.1.3. L'ingestion

L'ingestion est, avec la micro-injection, le mode d'application des dsRNAs le plus documenté (List *et al.*, 2022). Tout comme l'application topique, l'application par ingestion semble plus envisageable en agriculture. Elle a notamment pu être décrite comme la méthode d'application la plus appropriée dans le contrôle des insectes nuisibles (Kunte *et al.*, 2020; Zhu et Palli, 2020). Cette application inclut l'utilisation d'une alimentation artificielle contenant les dsRNAs (Rangasamy et Siegfried, 2012), de plantes génétiquement modifiées qui peuvent les synthétiser (Head *et al.*, 2017), de feuilles imbibées avec une solution contenant des dsRNAs (Camargo *et al.*, 2018) ou l'ingestion directe de cette dernière (Sapountzis *et al.*, 2014). Il a été rapporté que, de façon générale, les efficacités des dsRNAs délivrés par micro-injection et ingestion seraient similaires (List *et al.*, 2022). Cependant, cette notion doit être discutée car la comparaison de ces efficacités ne prend pas en compte tous les facteurs pouvant les influencer (voir partie 3.3 de ce chapitre). Malgré tout, l'efficacité des dsRNAs par ingestion semble plus variable d'une espèce à l'autre que pour les autres méthodes d'application. En effet, l'administration orale de dsRNAs est notamment très efficace chez les coléoptères (Baum *et al.*, 2007; Rangasamy et Siegfried, 2012; Palli, 2014; Khajuria *et al.*, 2015). A l'inverse, l'administration par voie orale entraîne une faible efficacité de l'ARNi chez de nombreuses autres espèces d'insectes. Chez le criquet *Locusta migratoria*, par exemple, l'efficacité de l'ARNi est élevée si le dsRNA d'intérêt est appliqué par micro-injection mais faible s'il est administré par ingestion (Song *et al.*, 2019). Les auteurs ont notamment pu démontrer, dans ce cas, l'implication dans la faible efficacité de l'ARNi d'endonucléases, qui sont présentes dans le système digestif de l'insecte et qui sont responsables de la dégradation des dsRNAs.

3.2. Encapsulation des dsRNAs dans des nanoparticules

Un des facteurs majeurs limitant l'efficacité des dsRNAs, notamment par ingestion, chez l'insecte est leur dégradation par des endonucléases dans le système digestif empêchant ainsi leur absorption cellulaire et leur systématisation. Les stratégies d'encapsulation des dsRNAs dans des nanoparticules semblent les plus étudiées actuellement pour prévenir leur dégradation et/ou favoriser leur absorption cellulaire (Zhu et Palli, 2020). Les nanoparticules mesurent entre un et quelques centaines de nanomètres et peuvent être composées de matériaux organiques ou inorganiques (Silver *et al.*, 2021). La diversité de nanoparticules envisagées et étudiées pour augmenter l'efficacité des dsRNAs chez les insectes nuisibles est en perpétuelle croissance ces dernières années. Parmi celles-ci, on peut citer les liposomes cationiques, les polymères, les virus et les particules pseudo-virales (VLPs pour « Virus-like particles » ; figure 29).

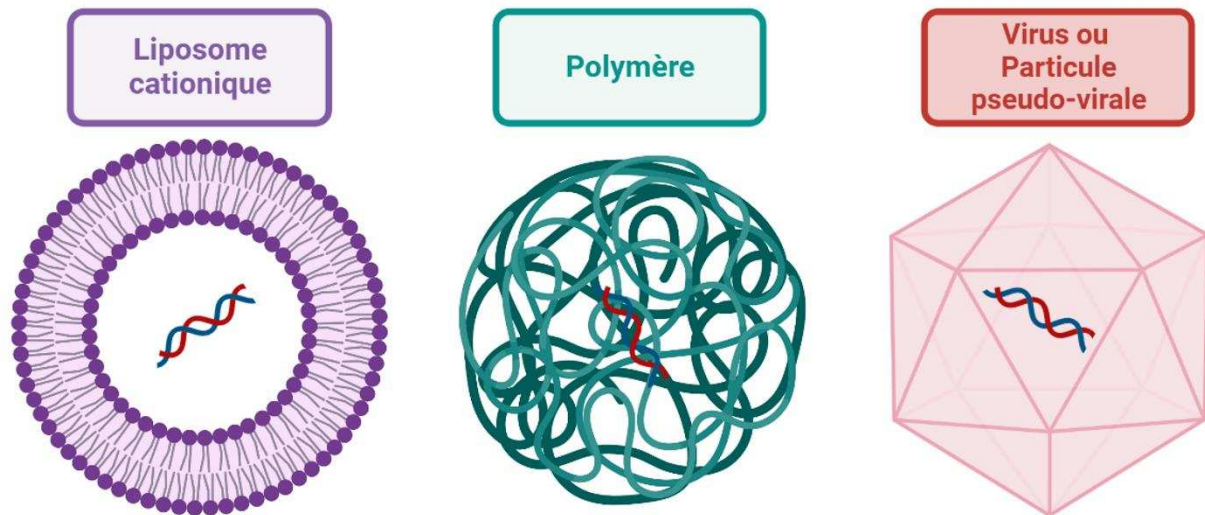


Figure 29 : Exemples de nanoparticules étudiées et envisagées pour encapsuler les dsRNAs et augmenter leur efficacité dans la lutte contre les insectes nuisibles.

3.2.1. Les liposomes cationiques

Les liposomes cationiques sont des vésicules artificielles sphériques facilement biodégradables et synthétisées à partir de lipides naturels non toxiques. L'encapsulation des dsRNAs dans des liposomes cationiques, ou lipoplexes, est facilement réalisable à partir de réactifs de transfection. En effet, la formation de lipoplexes est permise par la mise en place d'interactions électrostatiques entre les lipides cationiques chargés positivement contenus dans ces réactifs et les ARNs chargés négativement (Zuhorn *et al.*, 2007). L'un des avantages de ce type de nanoparticules est son caractère semi-perméable qui simule les membranes biologiques, ce qui permet une diffusion facilitée des composés qu'elles transportent grâce à leur capacité de pénétration cellulaire (Hernández-Soto et Chacón-Cerdas, 2021). En effet, il a été démontré chez diverses espèces d'insectes qu'encapsuler des dsRNAs dans des liposomes cationiques permet de faciliter leur absorption

cellulaire (Gurusamy *et al.*, 2020a). De plus, l'utilisation de liposomes cationiques permet de protéger les dsRNAs contre les endonucléases présentes dans le système digestif des insectes (Lin *et al.*, 2017; Gurusamy *et al.*, 2020a; Wang *et al.*, 2020) et par conséquent d'augmenter l'efficacité des dsRNAs lorsqu'ils sont ingérés (tableau 13).

Espèce	Gène cible	Efficacité Non-encapsulé vs Encapsulé	Réf
<i>Blattella germanica</i>	<i>tub</i>	Diminution d'expression (qPCR) ≈ 10 vs 40% Mortalité induite (tests de mortalité) ≈ 0 vs 70%	Lin <i>et al.</i> , 2017
<i>Drosophila melanogaster</i> transgénique <i>gus</i>	<i>gus</i> (β-glucuronidase)	Diminution d'activité enzymatique ≈ 5 vs 50%	Whyard <i>et al.</i> , 2009
<i>Euschistus heros</i>	<i>vATPase A</i>	Mortalité induite (tests de mortalité) ≈ 30 vs 50%	Castellanos <i>et al.</i> , 2019
	<i>act-2</i>	Mortalité induite (tests de mortalité) ≈ 30 vs 50%	Castellanos <i>et al.</i> , 2019
<i>Drosophila suzukii</i>	<i>vha26</i>	Mortalité induite (tests de mortalité) ≈ 0 vs 40%	Taning <i>et al.</i> , 2016
<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>SfV-ATPase</i>	Mortalité induite (tests de mortalité) ≈ 15 vs 40%	Yao <i>et al.</i> , 2022
<i>Chilo suppressalis</i>	<i>G3PDH</i>	Diminution d'expression (qPCR) ≈ 0 vs 20%	Wang <i>et al.</i> , 2020

Tableau 13 : Tableau non-exhaustif illustrant l'augmentation de l'efficacité de l'ARNi chez diverses espèces d'insectes lorsque les dsRNAs ingérés sont encapsulés dans des liposomes cationiques. La dénomination des gènes cibles indiquée est celle présentée par les auteurs.

3.2.2. Les polymères

La complexation des dsRNAs avec des polymères peut également améliorer leur stabilité et donc l'efficacité de l'ARNi chez les insectes nuisibles. En effet, tout comme les liposomes cationiques, l'encapsulation des dsRNAs dans ces nanoparticules a permis d'empêcher leur dégradation dans le système digestif de l'insecte (Gurusamy *et al.*, 2020b; Wang *et al.*, 2020; Cooper *et al.*, 2021). Ce type d'encapsulation est envisagé car ces nanoparticules sont stables, biodégradables et la modification de leur surface permettant de favoriser leur absorption cellulaire est facilement réalisable. Cependant, contrairement à la fabrication de lipoplexes, leur production nécessite plus de matériels et est plus laborieuse (Joga *et al.*, 2016). Cette technologie a été explorée pour la première fois en utilisant le chitosane comme polymère pour améliorer la réponse d'ARNi chez le moustique *Anopheles gambiae* (Zhang *et al.*, 2010). Comme les polymères de chitosane sont chargés positivement, ils sont attirés électrostatiquement par les dsRNAs chargés négativement, ce qui forme des complexes dsRNAs/polymères. Aujourd'hui, d'autres types de polymères sont étudiés (Hernández-Soto et Chacón-Cerdas, 2021) et l'augmentation de l'efficacité des dsRNAs encapsulés dans ces nanoparticules a pu être rapportée lorsqu'ils sont ingérés par des insectes (tableau 14).

Espèce	Gène cible	Efficacité Non-encapsulé vs Encapsulé	Réf
<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>inhibitor of apoptosis</i>	Diminution d'expression (qPCR) ≈ 30 vs 40% Mortalité induite (tests de mortalité) ≈ 25 vs 50%	Gurusamy <i>et al.</i> , 2020b
<i>Spodoptera exigua</i>	<i>chitine synthase B</i>	Mortalité induite (tests de mortalité) ≈ 15 vs 50%	Christiaens <i>et al.</i> , 2018
<i>Chilo suppressalis</i>	<i>G3PDH</i>	Diminution d'expression (qPCR) ≈ 0 vs 40%	Wang <i>et al.</i> , 2020
<i>Aedes aegypti</i>	<i>IAP1</i>	Mortalité induite (tests de mortalité) ≈ 15 vs 40%	Dhandapani <i>et al.</i> , 2019

Tableau 14 : Tableau non-exhaustif illustrant l'augmentation de l'efficacité de l'ARNi chez diverses espèces d'insectes lorsque les dsRNAs ingérés sont encapsulés dans des polymères. La dénomination des gènes cibles indiquée est celle présentée par les auteurs.

3.2.3. Les virus et particules pseudo-virales

L'utilisation de virus pour optimiser l'efficacité des dsRNAs chez les insectes a également été étudiée. En effet, leur enveloppe virale joue un rôle essentiel dans l'infection virale en interagissant avec les récepteurs de la cellule hôte et en protégeant l'intégrité de leur matériel génétique lorsque le virus est exposé à des facteurs environnementaux extracellulaires agressifs comme les enzymes de dégradation (Kolliopoulou *et al.*, 2017; Kolliopoulou *et al.*, 2020). Cette stratégie se base sur l'utilisation de virus d'insectes ou de plantes pour exprimer des dsRNAs spécifiques de l'insecte cible. Pour ce faire, un gène est généralement modifié ou ajouté au virus en question de telle sorte que le dsRNA d'intérêt soit produit lors de la réplication virale. Dans le cas de virus de plantes modifiés, le dsRNA d'intérêt est produit en grande quantité dans le phloème et sera ingéré par les insectes cibles venus se nourrir sur la plante. Notamment, l'ingestion de dsRNAs produits dans des plantes infectées avec un virus de la mosaïque du tabac modifié s'est avérée efficace chez certaines espèces d'insectes (tableau 15). De plus, l'utilisation de virus d'insectes pour délivrer les dsRNAs a également pu être rapportée dans la littérature (tableau 16). Dans ce cas, les insectes sont directement infectés par un virus modifié.

Espèce	Gène cible	Effets	Réf
<i>Bactericera cockerelli</i>	<i>BC-ATPase</i>	- Diminution de l'expression du gène cible - Diminution de la fécondité	Wuriyangan et Falk, 2013
<i>Planococcus citri</i>	<i>CH1S</i> ou <i>vATPase</i>	- Diminution de l'expression des gènes cibles - Diminution de la fécondité - Augmentation de la mortalité	Khan <i>et al.</i> , 2013
<i>Mythimna separata</i>	<i>MseChi1</i> ou <i>MseChi2</i>	- Diminution de l'expression des gènes cibles - Diminution du poids du corps	Bao <i>et al.</i> , 2016

Tableau 15 : Tableau non-exhaustif illustrant l'efficacité des dsRNAs ingérés par diverses espèces d'insectes à partir de plantes infectées avec un virus de la mosaïque du tabac modifié. La dénomination des gènes cibles indiquée est celle présentée par les auteurs.

Espèce	Virus modifié	Gène cible	Effets	Réf
<i>Sesamia nonagrioides</i>	Baculovirus	<i>SnJHER</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de l'expression du gène cible - Développement altéré 	Kontogiannatos <i>et al.</i> , 2013
<i>Aedes albopictus</i>	Densovirus	<i>V-ATPase</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de l'expression du gène cible - Augmentation de la mortalité 	Gu <i>et al.</i> , 2011
<i>Drosophila melanogaster</i>	Flock House	<i>vha26</i> <i>alpha COP</i> <i>RPS13</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution de l'expression des gènes cibles - Augmentation de la mortalité 	Taning <i>et al.</i> , 2018

Tableau 16 : Tableau non-exhaustif illustrant l'efficacité des dsRNAs délivrés à partir d'un virus d'insecte modifié. La dénomination des gènes cibles indiquée est celle présentée par les auteurs.

Les limites à l'utilisation de virus de plantes ou d'insectes modifiés ont pu être discutées. Notamment, l'infection d'une plante ou d'un insecte avec un virus peut inhiber la machinerie cellulaire responsable de la réponse induite par l'ARNi chez l'insecte cible car des suppresseurs sont généralement retrouvés dans les génomes viraux. De plus, le virus peut causer des effets délétères sur la plante hôte infectée (Silver *et al.*, 2021) et l'utilisation d'agent pathogène peut être critiquée et présente le risque de ne pas être acceptée par la population. En ce sens, les VLPs ont un intérêt particulier dans la lutte contre les insectes nuisibles (Deshayes *et al.*, 2022; Xue *et al.*, 2023). Ils sont définis comme des structures produites par l'auto-assemblage de protéines structurelles virales. Ainsi, leur structure est similaire à celle de virions natifs. Cependant, contrairement à ces derniers, les VLPs ne sont pas infectieux car ils ne présentent pas de génome viral et sont donc incapables de se répliquer (Nooraei *et al.*, 2021). Il a ainsi été suggéré que les VLPs pourraient être une alternative intéressante à l'utilisation des virus pour encapsuler les dsRNAs et améliorer leur efficacité (Xue *et al.*, 2023).

3.3. Importance de la conception des dsRNAs

Bien que les différentes stratégies d'encapsulation décrites précédemment soient très documentées, de plus rares études se sont intéressées à la conception et à la modification des dsRNAs d'intérêt pour accroître leur efficacité. Notamment, l'importance de la conception des dsRNAs et de leur séquence dans l'efficacité de la réponse de l'ARNi a été discutée. En effet, il a pu être démontré chez le doryphore *Leptinotarsa decemlineata*, par l'évaluation de l'expression du gène cible et des tests de mortalité, que les dsRNAs d'intérêt doivent au moins présenter 97% d'identité avec le transcrite cible pour maximiser leur efficacité (He *et al.*, 2020). Ainsi, maximiser la complémentarité de séquence entre le dsRNA et le transcrite cible est nécessaire pour augmenter l'efficacité de la réponse d'ARNi associée.

L'importance de la sélection du gène cible dans l'efficacité de l'ARNi a largement été discutée (Silver *et al.*, 2021). Cependant, des variations d'efficacité des dsRNAs ciblant des zones différentes d'un même transcrite ont aussi pu être rapportées. En effet, chez le moustique *Aedes aegypti*, des variations de l'efficacité des dsRNAs ciblant différentes zones de la séquence codante du gène de la sous-unité α du canal Na_v ont pu être démontrées par qPCR (Bona *et al.*, 2016). Les mécanismes sous-jacents impliqués dans ces variations

d'efficacité de l'ARNi selon les régions ciblées sur un même gène sont encore inconnus. En revanche, il a pu être rapporté que le clivage des dsRNAs en siRNAs peut être affecté par leur séquence. Ruobing Guan et ses collaborateurs ont démontré, par une analyse RNAseq, l'existence de triplets de nucléotides où le clivage des dsRNAs est favorisé chez diverses espèces d'insectes. Chez le papillon *Ostrinia furnacalis* et l'armigère *Helicoverpa armigera*, ce clivage est préférentiellement réalisé au niveau du triplet GGU alors que, pour le scarabée *Tribolium castaneum*, les triplets qui semblent favorables au clivage sont AAG, GUG et GUU (Guan et al., 2018).

Enfin, d'autres facteurs tels que la longueur des dsRNAs, leur dose, des modifications de leur structure ou la répétition de la séquence du dsRNA peuvent également moduler l'efficacité de la réponse d'ARNi (Flynt, 2021; Silver et al., 2021).

4. L'interférence ARN dans la lutte contre les insectes

4.1. Les dsRNAs comme agent de biocontrôle

Depuis le développement de SmartStax PRO, les premières cultures de maïs composées de plantes génétiquement modifiées qui combinent l'utilisation d'un dsRNA dirigé contre la protéine « sucrose non-fermenting 7 » (DvSnf7) qui est une protéine de tri vacuolaire appartenant au complexe ESCRT III (Endosomal Sorting Complex Required Transport) et la toxine *Bacillus thuringiensis* pour contrôler les populations de chrysomèle *Diabrotica virgifera virgifera*, par Bayer et sa mise sur le marché au Canada en 2016 et aux Etats-Unis un an plus tard, l'ARNi apparaît comme un moyen efficace pour contrôler les populations d'insectes ravageurs (Head et al., 2017; Cagliari et al., 2019). Cependant, l'utilisation de stratégies nécessitant la modification génétique d'organismes pour synthétiser et sécréter des dsRNAs (ou « Transformative strategies »), tels que les plantes citées précédemment, ne semble pas adaptée pour lutter de façon durable contre les insectes nuisibles. En effet, des premiers cas de résistances à l'ARNi ont pu être décrits après l'utilisation de telles plantes génétiquement modifiées (Khajuria et al., 2018). Dans ce cas, les plantes transgéniques synthétisent en continue les dsRNAs d'intérêt, ce qui augmente la pression de sélection et favorise le développement de phénomènes de résistance chez les insectes ravageurs. En ce sens, l'intérêt de stratégies ne nécessitant pas de modification génétique (ou « Non-transformative strategies ») pour lutter de façon durable contre les insectes nuisibles a pu être argumenté (Cagliari et al., 2019). Ces dernières offrent la possibilité de contrôler la dose de dsRNAs appliquée et de limiter l'éventuelle rémanence de ces derniers dans l'environnement. A ce jour et selon cette dernière stratégie, divers dsRNAs ont montré un effet bioinsecticide chez diverses espèces d'insectes qui appartiennent à différentes ordres (tableau 17). Notamment, des gènes cibles relativement récurrents peuvent être identifiés tels que les gènes qui codent pour des protéines essentielles comme la sous-unité A de la V-ATPase (Castellanos et al., 2019; Pinheiro et al., 2020; Martinez et al., 2021; Nishide et al., 2021; Yao et al., 2022), l'enzyme capable d'hydrolyser les molécules d'ATP, ou encore pour des protéines inhibitrices de l'apoptose (ou iap pour « inhibitor of apoptosis » ; Dhandapani et al., 2019; Dhandapani et al., 2020; Gurusamy et al., 2020b; Nishide et al., 2021). De plus, et contrairement aux insecticides qui sont majoritairement neurotoxiques, les études relatant l'utilisation de dsRNAs pour perturber le SNC de l'insecte et provoquer leur mort semblent moins nombreuses. Parmi ces études, utiliser des dsRNAs qui

ciblent les gènes qui codent pour la synapsine, une protéine impliquée dans la libération du neurotransmetteur dans la synapse (Qu *et al.*, 2022), ou encore le canal Na_v (Abd El Halim *et al.*, 2016) s’est avéré efficace pour induire la mort des insectes. Quant au système cholinergique en particulier, seuls des dsRNAs dirigés contre les gènes qui codent pour l’AChE semblent avoir été considérés comme bioinsecticide à ce jour (Mou *et al.*, 2017; Sharath Chandra *et al.*, 2019). Cependant, la majorité de ces études se concentre sur le ciblage de protéines relativement conservées chez tous les insectes. Sachant qu’épargner les organismes non-cibles comme les insectes bénéfiques tels que l’abeille *Apis mellifera* est un enjeu important dans la conception de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes ravageurs, le choix de la protéine cible et de la région protéique d’intérêt est un critère indispensable pour la synthèse du dsRNA.

Ordre	Espèce	Gène cible	Application	Mortalité induite	Réf
Coléoptère	<i>Tribolium castaneum</i>	<i>TcNav</i>	Injection	≈ 70%	Abd El Halim <i>et al.</i> , 2016
	<i>Anthonomus grandis</i>	<i>AgCHS2</i>	Injection	≈ 100%	Macedo <i>et al.</i> , 2017
	<i>Anoplophora glabripennis</i>	<i>IAP</i> <i>SNF7</i> <i>SSK</i>	Ingestion	≈ 90% ≈ 75% ≈ 80%	Dhandapani <i>et al.</i> , 2020
	<i>Myllocerus undecimpustulatus undatus</i>	<i>Prosa2</i> <i>RPS13</i> <i>Snf7</i> <i>V-ATPase A</i>	Ingestion	≈ 70% ≈ 55% ≈ 90% ≈ 45%	Pinheiro <i>et al.</i> , 2020
Hémiptère	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	<i>ApCPR</i>	Injection	≈ 100%	Qiao <i>et al.</i> , 2022
	<i>Plautia stali</i>	<i>vATPase</i> <i>IAP</i> <i>MCO2</i> <i>SNF7</i>	Injection et ingestion	≈ 100%	Nishide <i>et al.</i> , 2021
	<i>Aphis gossypii</i>	<i>syn</i>	Topique	≈ 100%	Qu <i>et al.</i> , 2022
	<i>Aphis citricidus</i>	<i>Tcace1</i> <i>Tcace2</i>	Insecte placé sur une feuille imbibée	≈ 25% ≈ 15%	Mou <i>et al.</i> , 2017
	<i>Diaphorina citri</i>	<i>DcCP64</i>	Topique	≈ 70%	Yu <i>et al.</i> , 2022
Lépidoptère	<i>Plutella xylostella</i>	<i>AChE</i>	Topique	≈ 70%	Sharath Chandra <i>et al.</i> , 2019
	<i>Heliothis virescens</i>	<i>PBAN</i>	Ingestion	≈ 60%	Choi et Vander Meer, 2019
	<i>Chilo suppressalis</i>	<i>CYP16C1</i>	Ingestion	≈ 50%	Sun <i>et al.</i> , 2020
	<i>Spodoptera exigua</i>	<i>V-ATPase-A</i>	Ingestion	≈ 50%	Martinez <i>et al.</i> , 2021
Orthoptère	<i>Locusta migratoria</i>	<i>Lm-nxf1</i>	Injection	≈ 100%	Xie <i>et al.</i> , 2019
Diptère	<i>Culex pipiens pallens</i>	<i>CpAk1</i> <i>CpAk2</i>	Injection	≈ 40% ≈ 20%	Qian <i>et al.</i> , 2022
Blattoptère	<i>Blattella germanica</i>	<i>tub</i>	Ingestion	≈ 60%	Lin <i>et al.</i> , 2017

Tableau 17 : Tableau non-exhaustif d’espèces d’insectes, appartenant à divers ordres, chez lesquelles un effet bioinsecticide de certains dsRNAs a été rapporté. Le traitement des insectes avec ces dsRNAs a été réalisé à partir d’une stratégie n’impliquant pas de modification génétique (« Non-transformatives strategies »). La dénomination des gènes cibles indiquée est celle présentée par les auteurs.

4.2. Utilisation des dsRNAs couplés aux insecticides

Mise à part l'utilisation des dsRNAs comme agent de biocontrôle des populations d'insectes nuisibles, diverses études ont rapporté leur utilisation dans le développement de nouvelles stratégies de gestion de la résistance aux insecticides en ciblant des protéines clés dans ces mécanismes. En effet, l'utilisation de dsRNAs dirigés contre les gènes *CYP4G70*, *CYP4DA1*, *CYP4DB1*, *CYP4C67* et *CYP4C68* chez des souches résistantes de psylle asiatique *Diaphorina citri* a permis de rétablir leur sensibilité à l'IMI (Killiny *et al.*, 2014). De la même façon, l'utilisation de dsRNAs ciblant des gènes qui codent pour une GST ou une hydroxyacide-oxoacide transhydrogénase a permis d'augmenter la sensibilité au THIAM de souches de l'aleurode du tabac *Bemisia tabaci* résistantes à cet insecticide (Yang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). Cependant, à l'heure actuelle aucune étude ne semble avoir rapporté l'utilisation de l'ARNi pour contourner les mécanismes d'accommodation aux insecticides mis en place par les insectes. Ainsi, l'utilisation de la technique d'ARNi pourrait limiter l'augmentation des doses d'insecticides nécessaires pour lutter efficacement contre des espèces d'insectes moins sensibles à ces composés.

En complément, des études ont rapporté l'utilisation combinée de l'ARNi et des insecticides pour favoriser la mortalité au sein de populations d'insectes ravageurs. En effet, l'utilisation d'un dsRNA qui cible la synapsine, une protéine impliquée dans la neurotransmission, chez le puceron *Aphis gossypii* a conduit à la mort d'environ 50% des insectes et lorsqu'il est combiné au THIAM, le taux de mortalité observé devient environ égal à 80% (Qu *et al.*, 2022). Une seconde étude réalisée chez le puceron *Acyrtosiphon pisum* a permis de démontrer que l'utilisation de dsRNAs qui ciblent la NADPH-cytochrome P450 reductase induit la mort d'environ 40% de ces insectes. De plus, lorsque l'injection de ces dsRNAs est couplée au chlorpyrifos, à l'IMI ou à la β -cyperméthrine, le taux de mortalité observé est augmenté à environ 70%, 80% et 85% respectivement (Qiao *et al.*, 2022). Pour conclure, ces études suggèrent que l'utilisation de dsRNAs combinée à un insecticide neurotoxique pourrait être une solution envisageable pour diminuer les doses d'insecticide répandues en champs.

Chapitre 4 : Objectifs de la thèse

Comme décrit en avant-propos de ce manuscrit, produire en quantité suffisante pour répondre aux besoins alimentaires croissants de la population mondiale est actuellement un enjeu majeur. Bien que les produits phytopharmaceutiques, tels que les insecticides, ont permis de protéger les cultures contre les insectes ravageurs pour augmenter les rendements agricoles, leur utilisation est aujourd'hui décriée. En effet, l'utilisation des insecticides à fortes doses conduit à des effets néfastes sur des organismes non-cibles comme les abeilles ou l'Homme mais également sur l'environnement. De plus, l'apparition de phénomènes de résistance et d'accommodation à ces traitements, qui limitent leur efficacité, est un frein à leur utilisation. Ainsi, il est devenu indispensable de développer des outils capables d'optimiser l'utilisation des insecticides pour en réduire les doses utilisées en champs ou de nouvelles stratégies de lutte innovantes, efficaces et plus spécifiques des insectes ravageurs ciblés. La technique d'ARNi est aujourd'hui considérée comme l'une de ces nouvelles stratégies. Elle s'est avérée efficace pour contourner les mécanismes de résistance aux insecticides et comme agent de biocontrôle seul ou couplé à l'utilisation d'un insecticide pour en limiter les doses utilisées. Cependant, bien que les acteurs du système cholinergique soient des cibles privilégiées de nombreuses classes d'insecticides, l'utilisation de l'ARNi dirigée contre ces derniers pour lutter contre les insectes ravageurs reste encore peu explorée. En ce sens, l'objectif principal de ce travail de thèse est d'évaluer l'utilisation de la technique d'ARNi qui cible les acteurs du système cholinergique, et plus particulièrement les sous-unités nicotiques qui composent les nAChRs, dans la lutte contre les insectes ravageurs. Pour répondre à cette problématique, ce travail s'articule autour des trois axes suivants :

1) Les dsRNAs qui ciblent une sous-unité nicotinique peuvent-ils être envisagés comme agents de biocontrôle d'un insecte ravageur ou comme modulateur de l'efficacité d'un insecticide ? La première étude de ce manuscrit portera sur l'évaluation de l'effet de dsRNAs ciblant la sous-unité nicotinique divergente *Apisumβ2* (dsRNA-*Apisumβ2*) du puceron *Acyrtosiphon pisum* comme bioinsecticide ou comme modulateur positif de l'efficacité de l'IMI.

2) La technique d'ARNi ciblant l'AChE1 est-elle envisageable pour lutter efficacement contre le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* ? Dans la seconde étude, l'utilisation de dsRNAs ciblant l'AChE1 (dsRNA-*ApisumAChE1*) du puceron *Acyrtosiphon pisum* est évaluée comme agent de biocontrôle ou comme modulateur positif de l'efficacité des traitements insecticides actuellement utilisés pour lutter contre ce ravageur.

3) La technique d'ARNi qui cible une sous-unité nicotinique peut-elle être utilisée pour contourner les mécanismes d'accommodation aux insecticides ? La troisième étude se concentre sur l'utilisation de dsRNAs ciblant la sous-unité nicotinique *Pameβ1* (dsRNA- $\beta1$) de la blatte *Periplaneta americana* pour contourner le mécanisme d'accommodation à l'IMI mis en place par cet insecte après une exposition à une dose sublétales de cet insecticide.

En complément de ce travail, une quatrième étude ayant pour objectif de déterminer s'il existe d'autres mécanismes impliqués dans l'accommodation des blattes *Periplaneta americana* après une exposition à une

dose sublétales d'IMI a été réalisée afin d'identifier d'autres cibles pour l'ARNi. Plus précisément, existe-t-il d'autres cibles moléculaires potentielles de l'ARNi qui pourraient permettre de contourner les phénomènes d'accommodation aux insecticides ?

Matériels et méthodes

1. Les modèles d'insectes

1.1. Le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*

A ce jour, environ 5 000 espèces de pucerons ont été identifiées. Parmi celles-ci, environ 450 se développent et vivent sur des plantes cultivées et une centaine d'entre elles ont un impact majeur sur l'agriculture mondiale (Blackman et Eastop, 2017). Ces pucerons affaiblissent leurs plantes hôtes de diverses manières. Par exemple, en se nourrissant de phloème, ils détournent à leur profit les nutriments nécessaires à la croissance et à la reproduction des plantes. De plus, les pucerons sont des insectes vecteurs de maladie des plantes en transmettant de nombreux virus à leur plante hôte. En effet, près de 50% des virus phytopathogènes transmis par les insectes (275 sur 600) sont transmis par des espèces de pucerons (Nault, 1997; Katis *et al.*, 2007; Dedryver *et al.*, 2010). La lutte contre les pucerons repose encore largement sur l'utilisation d'insecticides. Cependant, une exposition répétée à de tels composés a conduit à l'apparition de phénomènes de résistance sévères (Bass *et al.*, 2014; Bass *et al.*, 2015; Troczka *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Ainsi, il devient urgent de développer des moyens de lutte alternatifs ou d'augmenter l'efficacité des traitements insecticides pour lutter efficacement contre les pucerons tout en réduisant les doses utilisées en champs.

Parmi les pucerons ravageurs de cultures, on retrouve le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. Sa classification est la suivante : règne = Animal ; embranchement = Arthropodes ; classe = Insectes ; sous-classe = Ptérogotes ; ordre = Hemipteria ; famille = Aphididae ; genre = *Acyrtosiphon* ; espèce = *pisum*. Le puceron du pois colonise de nombreuses légumineuses cultivées comme le pois, le haricot, la fève ou la luzerne. A l'échelle mondiale, la culture de fabacées représente la 2^{ème} production agricole après celle des céréales, ce qui équivaut à 13% des surfaces cultivées (Gepts *et al.*, 2005). Ainsi, le puceron du pois est responsable de la perte de centaines de millions de dollars tous les ans (Sadeghi *et al.*, 2009). Le génome de ce puceron a été séquencé mais n'est pas encore entièrement annoté (The International Aphid Genomics Consortium, 2010). A partir de ce génome, 11 sous-unités nicotiniques ont pu être identifiées chez ce puceron : Apisuma1-a4, Apisuma6-a10 et Apisumβ1-β2 (Dale *et al.*, 2010).

1.1.1. Cycle de vie

Une des caractéristiques qui contribuent au succès des pucerons en tant que ravageurs de plantes réside dans la mise en place d'un cycle de vie complexe permis par une importante plasticité phénotypique. En effet, le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* présente un cycle de vie dit parthénogénétique cyclique, c'est-à-dire qu'au sein d'une population qui regroupe des individus ayant le même génotype, et selon les conditions environnementales, les pucerons ont la capacité d'alterner entre des reproductions sexuée et asexuée parthénogénétique. Après avoir passé l'hiver sous forme d'œuf (ou œuf d'hiver) qui peut résister à des

températures très basses allant jusqu'à -30°C , une femelle asexuée dite « fondatrice » émergera au début du printemps. Cette fondatrice produira par parthénogénèse vivipare d'autres femelles asexuées qui se reproduiront également de manière clonale et ce jusqu'à la fin de l'été. Ainsi, une dizaine de générations entièrement composées de femelles asexuées vivipares génétiquement identiques se succèdent durant cette phase de reproduction asexuée (Jaquiéry *et al.*, 2013). Une fois que la durée des jours se raccourcit en fin d'été ou début d'automne, des femelles asexuées sexupares sont produites. Elles pourront donner naissance à des femelles et mâles sexués. Le déterminisme du sexe des pucerons se fait par un système XX/X0. En effet, les deux sexes sont diploïdes pour les chromosomes autosomes mais les femelles possèdent 2 chromosomes sexuels X (XX) et les mâles un seul (X0) (Hales *et al.*, 2002). Durant une unique reproduction sexuée, les femelles et les mâles sexués vont s'accoupler et produire un œuf d'hiver. Comme les mâles ne peuvent transmettre qu'un chromosome X à cause de la dégénérescence des gamètes 0, l'œuf d'hiver deviendra obligatoirement une femelle asexuée au début du printemps (figure 30).

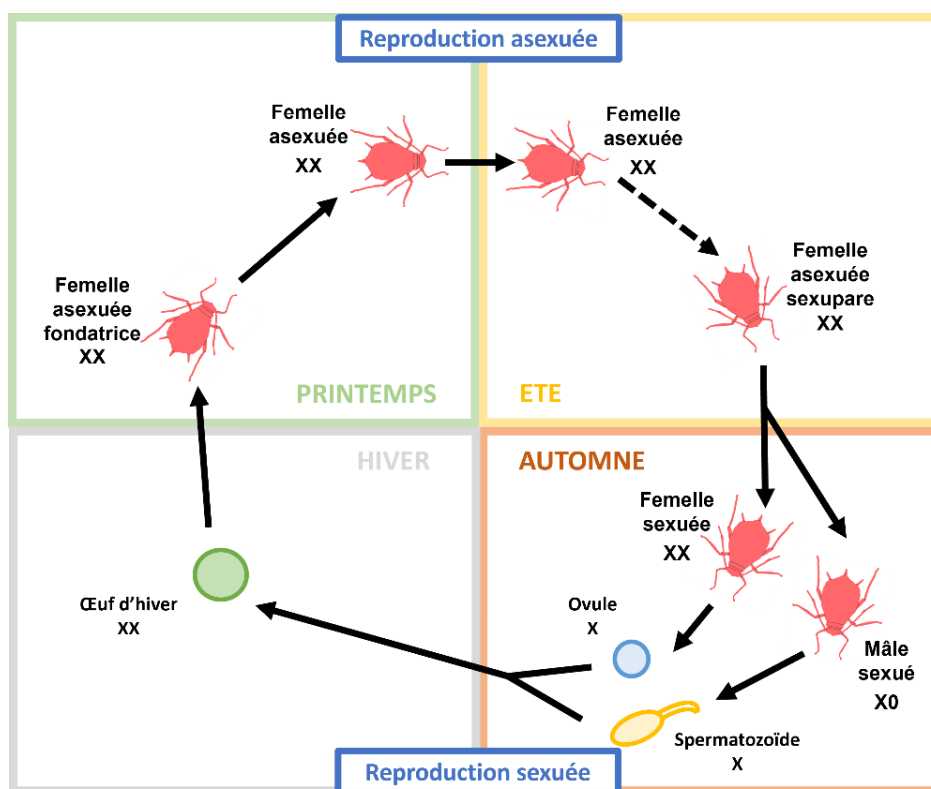


Figure 30 : Représentation schématique du cycle de reproduction du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. Basée sur Jaquiéry *et al.*, 2013.

1.1.2. Conditions d'élevage

Le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* a la possibilité de pouvoir exploiter la même plante hôte tout au long de sa vie si les conditions nécessaires sont réunies. Cette caractéristique permet d'élever simplement les pucerons sur des plants de féveroles au sein du laboratoire SiFCIR. Ces plantes sont exposées cycliquement à 16h de lumière et 8h d'obscurité à 20°C afin de pouvoir mimer les conditions environnementales nécessaires

à la reproduction asexuée des pucerons. Tous les 10 jours, 8 larves âgées d'un jour (figure 31A) sont délicatement déposées sur des nouveaux plants de féveroles à l'aide d'un pinceau humidifié. Une fois le stade adulte (figure 31B) atteint, soit 10 jours plus tard, les femelles asexuées sont récupérées pour les expérimentations et les larves qu'elles ont produites seront déposées sur de nouvelles plantes.

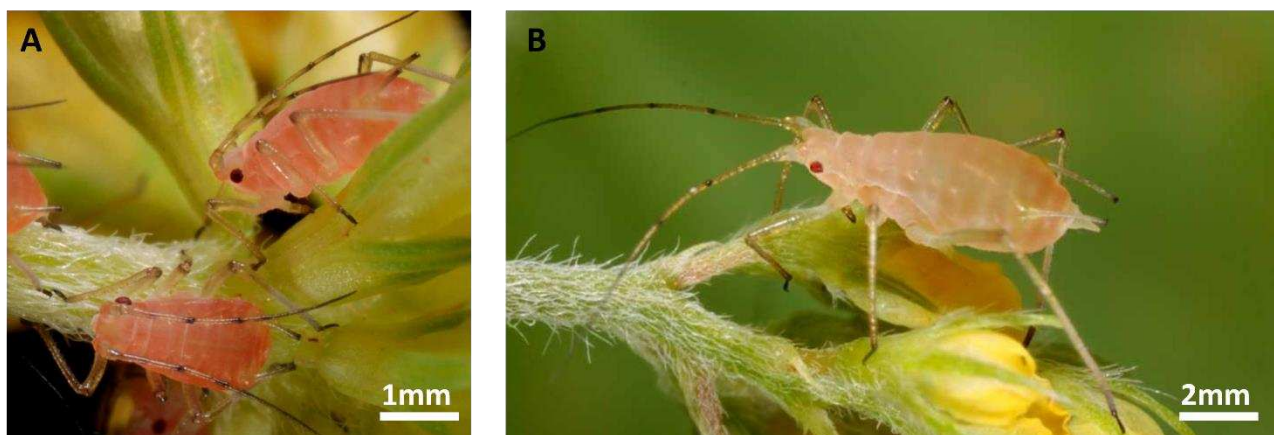


Figure 31 : Photographie de pucerons du pois *Acyrthosiphon pisum* aux stades larvaire (A) et adulte (B). Les photographies sont issues du site http://entomofaune.qc.ca/entomofaune/Pucerons/Acyrtosiphon_pisum.html.

1.1.3. Le système artificiel de nutrition

Au sein du laboratoire SIFCIR, les pucerons aux stades larvaire ou adulte peuvent être maintenus en vie dans un système artificiel de nutrition. Ce système correspond à celui décrit par Sadeghi *et al.* (2009). Il s'agit d'un tube de PVC dont les extrémités sont scellées par du parafilm étiré. Sur l'un des parafilms étirés, 200µL d'une solution nutritive sont déposés et recouverts par un troisième parafilm étiré (figure 32). La composition de cette solution est basée sur les travaux de Febvay *et al.* (1988) et est détaillée dans le tableau 18. Les pucerons percent le parafilm étiré grâce à leur rostre et peuvent ainsi ingérer la solution nutritive.

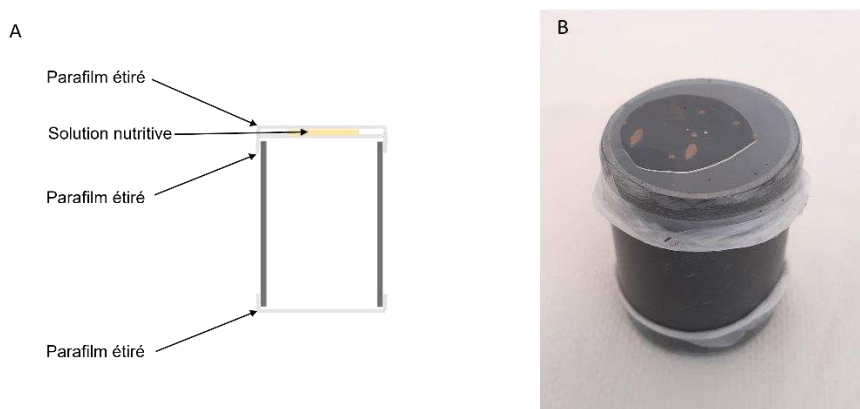


Figure 32 : Le système artificiel de nutrition. (A) Représentation schématique du système artificiel de nutrition. (B) Photographie d'un système artificiel de nutrition, où des pucerons aux stades adulte et larvaire ingèrent la solution nutritive.

Composé	Concentration finale (en mM)
Acide aminobenzoïque	0,7
L-Acide ascorbique	5,7
Vitamine B5	0,2
Vitamine B7	0,004
Choline chloride	3,6
Acide folique	0,02
D-Myo-Inositol	2,3
Nicotinamide	0,82
Pyridoxine hydrochloride	0,12
Riboflavine	0,013
Thiamine hydrchloride	0,074
Copper(II) sulfate pentahydrate	0,019
Iron(III) chloride hexahydrate	0,16
Manganese(II) chloride tetrahydrate	0,33
Sodium chloride	0,43
Zinc chloride	0,061
Calcium citrate tribasic tetrahydrate	0,16
Cholesteryl benzoate	0,051
Magnesium sulfate heptahydrate	9,82
L- α -Alanine	20,06
β -Alanine	0,7
L-Arginine	14,06
L-Asparagine monohydrate	19,88
L-Acide aspartique	6,63
L-Cystéine	2,44
L-Acide glutamique, sel monosodique, hydrate	10,15
L-Glutamine	30,49
Glycine	22,19
L-Histidine, HCl, hydrate	6,49
L-Isoleucine	12,56
L-Leucine	17,65
L-Lysine hydrochloride	19,22
L-Méthionine	4,85
L-Ornithine monohydrochloride	0,56
L-Phenylalanine	17,83
L-Proline	11,23
L-Sérine	11,83
L-Thréonine	10,67
L-Tryptophane	2,09
L-Tyrosine	2,13
L-Valine	16,29
Saccharose	584,28
Potassium phosphate	18,37
H ₂ O qsp 100mL	-
pH ajusté à 7,5	-

Tableau 18 : Composition de la solution nutritive ingérée par les pucerons *Acyrtosiphon pisum*.

1.2. La blatte *Periplaneta americana*

La classification de la blatte *Periplaneta americana* est la suivante : règne = Animal ; embranchement = Arthropodes ; classe = Insectes ; sous-classe = Ptérogotes ; ordre = Blattaria ; famille = Blattellidae ; genre = *Periplaneta* ; espèce = *americana*. La blatte, en particulier l'espèce *Periplaneta americana*, est reconnue comme étant un bon modèle biologique pour les études neurobiologiques. Diverses préparations neuronales obtenues à partir de cet insecte représentent un excellent modèle cellulaire sur lequel différentes méthodes pharmacologique et électrophysiologique peuvent être appliquées pour étudier les effets des molécules neurotoxiques (Stankiewicz *et al.*, 2012). Les neurones « Dorsal Unpaired Median » (neurones DUM) d'insectes présentent un grand intérêt pour étudier les effets des molécules insecticides qui ciblent le système nerveux central. En effet, la plupart des cibles neuronales des molécules à effet insecticide sont exprimées et identifiées au niveau des neurones DUM de la blatte (Buckingham *et al.*, 1997; Raymond *et al.*, 2000; Courjaret et Lapied, 2001; Thany, 2009; Laviaille-Defaix *et al.*, 2010; Murillo *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2017; Benzidane *et al.*, 2017). Son génome a été séquencé mais n'est pas encore entièrement annoté (Li *et al.*, 2018b). De plus, l'étude récente de son génome a permis d'identifier 19 sous-unités nicotiques allant de Pamea1 à Pamea9 et de Pameβ1 à Pameβ10. Ainsi, la blatte *Periplaneta americana* est à ce jour l'insecte qui présente le plus de sous-unités nicotiques identifiées au sein de son génome (Jones *et al.*, 2021).

1.2.1. Cycle de vie

La blatte *Periplaneta americana* possède une métamorphose incomplète, ce qui signifie que la blatte ne présente pas de stade pupe et que la morphologie des nymphes est similaire à celle des adultes. La blatte présente trois stades de vie : le stade d'œuf, un nombre variable de stades nymphaux et un stade adulte ou *imago* (Adedara *et al.*, 2022). Les œufs de *Periplaneta americana* pondus sont regroupés dans une oothèque. Chaque oothèque contient en moyenne 12 à 16 œufs (Fox et Bressan-Nascimento, 2006). Une femelle adulte produit environ 12 à 24 oothèques au cours de sa vie. Les œufs éclosent après environ six à huit semaines et deviennent adultes au bout de six à douze mois. Le dernier stade nymphal, appelé L5, subira une mue dite imaginale pour atteindre le stade adulte (figure 33C). Les adultes peuvent vivre jusqu'à environ deux ans (Adedara *et al.*, 2022). Les facteurs environnementaux tels que la température et l'humidité influent sur la durée de développement de la blatte.

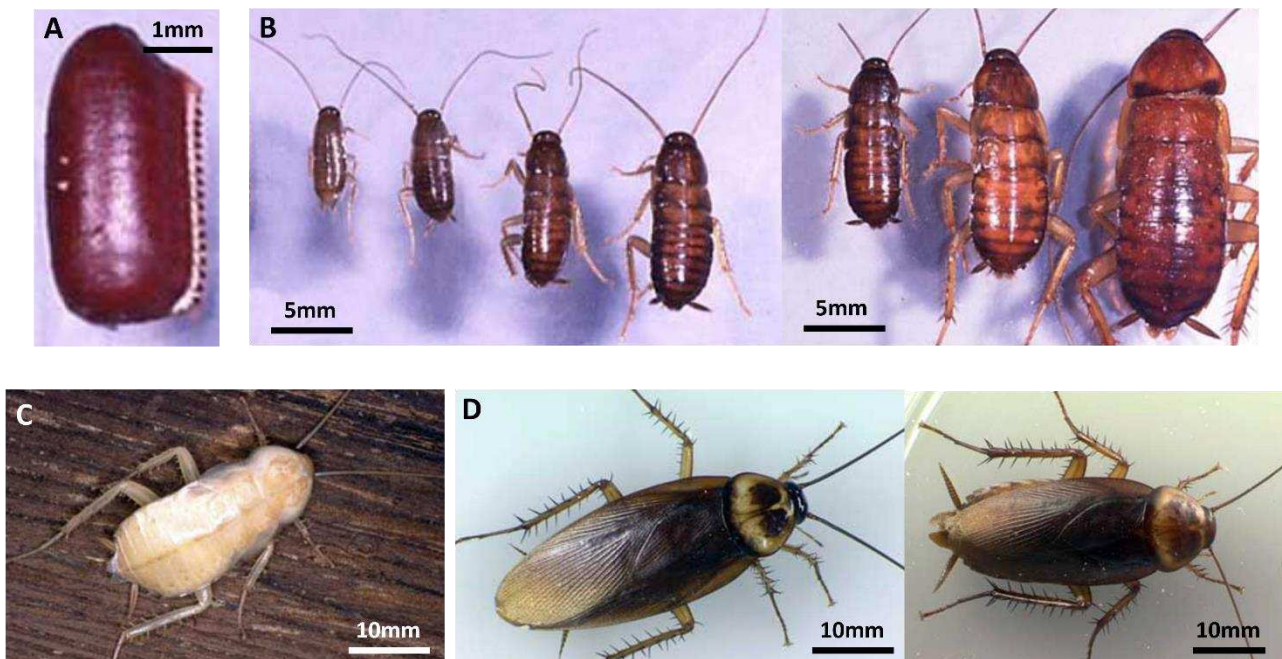


Figure 33 : Photographies représentant les différents stades de développement de la blatte *Periplaneta americana*. (A) Stade d'œuf : les œufs sont enfermés dans une oothèque. (B) Stades nymphaux. (C) Jeune blatte adulte qui vient de subir sa mue imaginale. (D) Stade adulte : il est représenté à gauche une blatte adulte mâle et à droite une blatte adulte femelle. Les photographies appartiennent à Paul M. Choate et P. G. Koehler de l'Université de Floride (<https://edis.ifas.ufl.edu/publication/IN298>).

Dans ce travail, toutes les expérimentations sur la blatte *Periplaneta americana* sont réalisées sur des insectes adultes mâles. Les blattes au stade adulte sont sélectionnées selon des critères morphologiques. En effet, les nymphes sont dépourvues d'ailes à leur naissance. Seules les blattes adultes présentent deux paires d'ailes, antérieure et postérieure, qu'elles obtiennent après leur mue imaginale. De plus, la largeur du corps de la blatte adulte est de 10mm au maximum et sa longueur varie entre 35 et 50mm (Grandcolas, 1996). Une fois les adultes isolés, les mâles et les femelles sont différenciés selon le dimorphisme sexuel de l'espèce. En effet, bien que les mâles et les femelles soient presque identiques en taille et en aspect, il existe quelques différences morphologiques. Les femelles présentent généralement un abdomen plus large que les mâles. Quant à eux, leurs ailes se prolongent de 4 à 8 mm au-dessus de l'extrémité de l'abdomen. De plus, les deux sexes présentent deux courts appendices à l'extrémité de l'abdomen appelés cerques mais les mâles possèdent en plus une paire de stylet (figure 34).

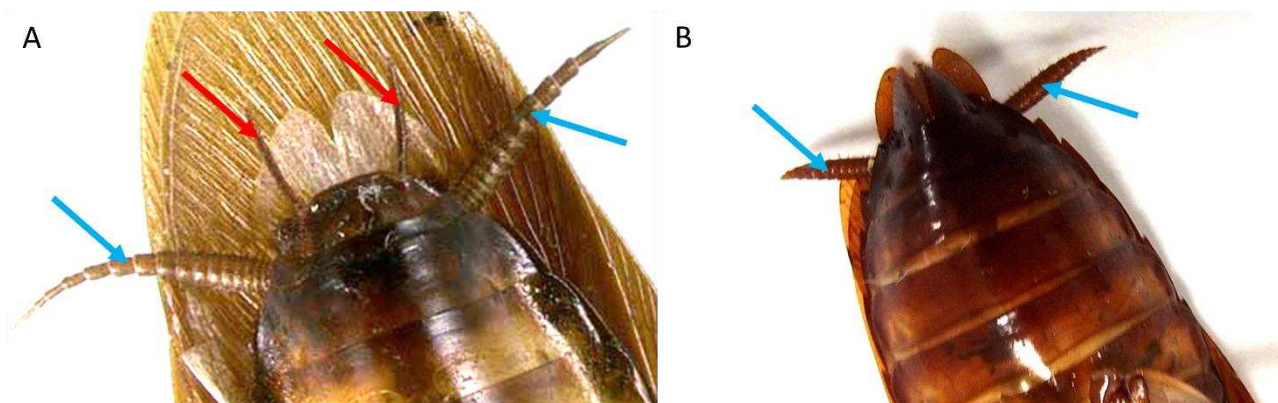


Figure 34 : Photographies illustrant le dimorphisme sexuel de la blatte *Periplaneta americana*. (A) Extrémité de l'abdomen d'un adulte mâle. (B) Extrémité de l'abdomen d'un adulte femelle. Les flèches bleues désignent les cerques. Les cerques sont composés de 18 à 19 segments pour les mâles et de 14 à 15 segments pour les femelles. Les flèches rouges indiquent la paire de stylet présente uniquement chez les mâles. La photographie (A) appartient à P. G. Koehler de l'Université de Floride et la photographie (B) est une photographie personnelle.

1.2.2. Conditions d'élevage

Les blattes *Periplaneta americana* sont élevées au sein du laboratoire SiFCIR. Elles sont contenues dans des vivariums en plexiglass qui sont maintenus à une température constante de 29°C avec une photopériodicité alternant 12h de lumière et 12h d'obscurité. Chaque vivarium peut contenir jusqu'à environ 200 blattes à différents stades de développement. Les nymphes et les adultes peuvent évoluer au sein du même milieu. La présence de boîtes à œufs dans les vivariums permet de simuler les crevasses nécessaires à l'oviposition des œufs contenus dans une oothèque par les blattes adultes femelles. Les blattes disposent de nourriture pour chien riche en protéines et sont hydratées *ad libitum*.

1.2.3. Les neurones DUM, modèle cellulaire pour l'étude des effets des molécules à effet insecticide

Le système nerveux de la blatte *Periplaneta americana* est composé d'une chaîne nerveuse ganglionnaire ventrale. Elle est composée de quatre sous-catégories de ganglions :

- les ganglions cérébroïdes ou cerveau ;
- les ganglions sous-œsophagiens ;
- les ganglions thoraciques (Th1 à Th3) ;
- les ganglions abdominaux (A1 à A5 ; A6 ou dernier ganglion abdominal [DGA]).

A l'exception des ganglions cérébroïdes, tous les ganglions de la chaîne nerveuse de la blatte contiennent des neurones impairs qui sont localisés près de leur ligne médiane. Ces neurones sont dits impairs car contrairement à la majorité des neurones au sein du système nerveux central de l'insecte, ils ne présentent pas d'homologue (Bräunig et Pflüger, 2001). Les neurones impairs qui se situent dans la partie medio-dorsale du ganglion sont nommés neurones DUM. Les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* ont été décrits pour la première fois il y a plus de 40 ans (Crossman *et al.*, 1971). Ces neurones DUM d'insectes sont issus de cellules embryonnaires appelées « unpaired median neuroblast » (MNB) (Wang *et al.*, 1992; Bräunig et Pflüger,

2001). Les neurones DUM efférents retrouvés dans le DGA ont bien été caractérisés anatomiquement (Sinakevitch *et al.*, 1996) mais également électrophysiologiquement (Grolleau et Lapied, 2000; Defaix et Lapied, 2005; Laviaille-Defaix *et al.*, 2006). Il s'agit de cellules pyriformes avec un corps cellulaire mesurant de 40 à 60 μm (figure 35). Au cours de ce travail de thèse, la sélection des neurones DUM pour les expérimentations est réalisée selon ces critères morphologiques.

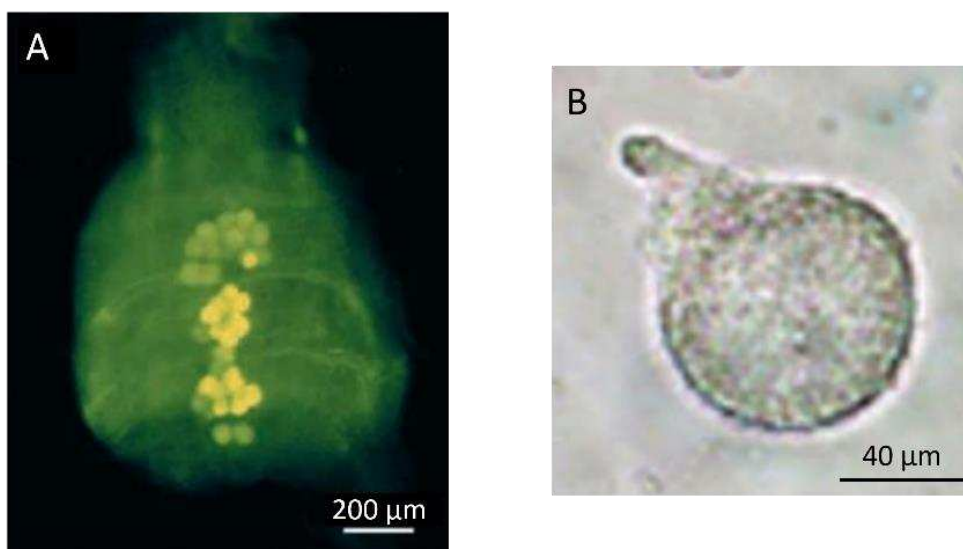


Figure 35 : Les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*. (A) Localisation des corps cellulaires des neurones DUM efférents au sein du DGA grâce à l'immunomarquage de l'octopamine. Il s'agit d'une amine biogène synthétisée par les neurones DUM efférents. (B) Photographie en microscopie optique d'un neurone DUM. Modifiée d'après Sinakevitch, 1995 et Lapied *et al.*, 2017.

2. Obtention des dsRNAs qui ciblent le système cholinergique

Au cours de ce travail de thèse, différents dsRNAs qui ciblent les acteurs du système cholinergique ont été conçus et produits afin d'évaluer leur potentiel en tant que bioinsecticide ou comme modulateur de l'efficacité d'un insecticide. L'obtention des dsRNAs qui ciblent les sous-unités Pamea7 (dsRNA-Pamea7.1 et dsRNA-Pamea7.2) et Pame β 1 (dsRNA-Pame β 1) de la blatte *Periplaneta americana* et la sous-unité Apisum β 2 (dsRNA-Apisum β 2) ainsi que l'AChE1 (ApisumAChE1 ; dsRNA-ApisumAChE1) du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* est détaillée dans la suite de ce manuscrit.

2.1. Conception des dsRNAs d'intérêt

L'ARNi présente un grand intérêt comme nouveau moyen de lutte contre les insectes ravageurs de culture. En tant qu'outil moléculaire de régulation de l'expression des gènes qui se base sur la complémentarité de séquence entre un siRNA, issu du clivage d'un dsRNA, et d'un ARNm cible, l'ARNi semble présenter une spécificité plus importante que les outils de lutte utilisés actuellement (Arora *et al.*, 2021). Ainsi, la sélection de

la séquence codante cible et donc de la séquence du dsRNA d'intérêt est une étape importante pour s'assurer de leur spécificité envers un gène donné au sein d'une espèce donnée.

Pour concevoir les dsRNA-Pamea7, dsRNA-Pameβ1 et dsRNA-Apisumβ2, toutes les séquences qui codent pour les sous-unités nicotiques identifiées chez la blatte ou le puceron ont été alignées grâce au logiciel Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) afin d'isoler les régions de séquence candidates en dehors des zones conservées. Les séquences codantes des gènes utilisées pour la conception des dsRNAs d'intérêt ainsi que leur numéro d'accèsion sont indiqués dans le tableau 19. Toutes les séquences candidates de 100 paires de bases (pb) sont ensuite alignées une à une avec chaque séquence qui code pour les sous-unités nicotiques identifiées chez les espèces cibles. Les séquences candidates qui présentent des successions d'au moins 10 nucléotides identiques avec un gène non-cible n'ont pas été retenues et la séquence qui présente les pourcentages d'identité avec les gènes non-cibles les plus faibles est sélectionnée. Enfin, cette séquence est alignée sur le génome entier de l'espèce cible (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) pour s'assurer qu'aucune complémentarité de séquence avec d'autres gènes non-cibles n'existe. Quant au dsRNA-ApisumAChE1, il a été conçu afin de cibler l'AChE1 du puceron. En parallèle, un dsRNA qui cible un gène bactérien qui code pour la β-galactosidase (dsRNA-LacZ) est également produit et utilisé comme contrôle dans ce travail. Il a été conçu à partir de la séquence nucléotidique d'un plasmide pCR-blunt (Zero Blunt™ PCR Cloning kit, Invitrogen). Les séquences de tous les dsRNAs utilisés dans ce travail de thèse sont indiquées dans le tableau 20.

Espèce	Gène	N° d'accèsion	Espèce	Gène	N° d'accèsion
<i>Periplaneta americana</i>	Pamea1	KP725463.1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Apisuma1	XM_008182407.3
	Pamea2	KP725464.1		Apisuma2	XM_008182417.3
	Pamea3	KR021292.1		Apisuma3	XM_008187942.3
	Pamea4	JN390946.1		Apisuma4	XM_029490651.1
	Pamea5	GFCQ01005211.1		Apisuma6	XM_016809606.2
	Pamea6	JF731243.1		Apisuma7	XM_001945189.5
	Pamea7	MW201211		Apisuma8	XM_001949983.5
	Pamea8	MW201212		Apisuma9	XM_016807628.1
	Pamea9	MW201214		Apisuma10	XM_016807463.2
	Pameβ1	MW201213		Apisumβ1	XM_029487953.1
	Pameβ2	GFCQ01032711.1		Apisumβ2	XM_001945029.5
	Pameβ3	GFCQ01027461.1		ApisumAChE1	XM_001948618.5
	Pameβ4	GAWS02039241.1		ApisumAChE2	XM_001948953.5
	Pameβ5	GFCQ01009686.1			
	Pameβ6	GFCQ01010089.1			
	Pameβ8	GFCQ01034959.1			
Pameβ9	GBJC01015771.1				

Tableau 19 : Liste des gènes ainsi que leur numéro d'accèsion utilisés pour la conception des dsRNAs d'intérêt.

Espèce	Nom	Séquence 5' → 3'
<i>Periplaneta americana</i>	dsRNA-Pamea7.1	ATGGAGTCAACAGCAGCCTCCGAGGCCTGCTCAACAGACCAAGGGCCTCCTCTGCC AGTCATGCCCCGATGGCTTCTCTTCGTCTGCATATGCATTGTGTC
	dsRNA-Pamea7.2	CGCCCACACGCATCACGAGGACGGCGGGGGCGGGGGGACGCTCCTGCACGG GGGCGGCGGGGGCTCCTCGTGCCTGGGCCCCACC CGGA ACTAACC
	dsRNA-Pameβ1	CCGCCGCACCCCTCGTACGGGTCCCCGCCGAAGTCCCAAGCACCTCGCGGTCAG CAGCACC AACCGCAGCAAGATGGAGGTGATGGAGCTGTCCGACC
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	dsRNA-Apisumβ2	TAGATGCTGCAATAACAGACAATTATGGGAAACAACATTGGAACGACACGTGGACGG ATAAGCTGAGAAGAGATTTATTGAGGTTCTACGATAGACACTC
	dsRNA-ApisumAChE1	GTCTGACAAAACTGTACAACCATAAGTGGAGGGACAAAACTAATATGATCAAGTT ATCGCTTTGGACAATTGTGATGACA ACTGTCGTTTTGATGTTA
<i>Escherichia coli</i>	dsRNA-LacZ	ATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACGCGTTAGAATACTCAAGCTATGCAT CAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCA

Tableau 20 : Fragments spécifiques des séquences nucléotidiques correspondant aux séquences des dsRNAs utilisés au cours de ce travail de thèse. Ces fragments sont spécifiques des séquences nucléotidiques qui codent pour les sous-unités nicotiniques Pamea7 et Pameβ1 de la blatte *Periplaneta americana* ainsi que pour la sous-unité nicotinique Apisumβ2 et pour l'AChE ApisumAChE1 du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*.

2.2. Production des dsRNAs d'intérêt

2.2.1. Production des ADNc nécessaires à l'obtention des dsRNAs d'intérêt

Les dsRNA-Pamea7.1, dsRNA-Pamea7.2, dsRNA-Pameβ1 et dsRNA-LacZ sont produits à partir de plasmides pCR-blunt dans lesquels est insérée soit la séquence qui code pour la sous-unité nicotinique Pameβ1 (pCR-blunt/Pameβ1) ou celle codant pour la sous-unité nicotinique Pamea7 (pCR-blunt/Pamea7) qui ont été obtenues précédemment au laboratoire SiFCIR (Bantz, 2020). Quant aux dsRNA-Apisumβ2 et dsRNA-ApisumAChE1, ils ont été produits à partir d'ADNc obtenus grâce à la transcription inverse des ARNs totaux extraits d'un puceron adulte. Le protocole pour obtenir ces ADNc est détaillé ci-dessous.

a) Extraction des ARNs totaux d'un puceron adulte

L'extraction des ARNs totaux est réalisée à l'aide du kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel). Ainsi, un puceron adulte est broyé à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax® dans 350µL de tampon de lyse RA1 auxquels ont été ajoutés 3,5µL de β-mercaptoéthanol. Le broyat est ensuite filtré dans une première colonne. Puis, 350µL d'éthanol à 70% sont ajoutés à la suspension afin d'ajuster les conditions de fixation des acides nucléiques pour qu'ils puissent être retenus sur une membrane de silice. Après fixation des acides nucléiques sur cette membrane, les sels présents sur cette dernière sont retirés à l'aide du tampon MDB. Ensuite, un traitement avec une DNase recombinante (rDNase) de 15 minutes à température ambiante est réalisé afin d'éliminer l'ADN génomique. L'enzyme est ensuite inactivée à l'aide du tampon RAW2. Après deux lavages successifs avec du tampon RA3 et le séchage de la membrane de silice, les ARNs totaux du puceron sont élués dans 40µL d'H₂O. La quantité et la qualité des ARNs sont évaluées grâce à un spectrophotomètre UV (SimpliNano, Thermofisher) par la mesure de l'absorbance à 260nm et des rapports d'absorbance A₂₆₀/A₂₈₀ et A₂₆₀/A₂₃₀ respectivement. Les ARNs totaux extraits sont conservés à -80°C.

b) Transcription inverse des ARNs totaux du puceron adulte en ADNc

Les ADNc sont obtenus grâce à une réaction de rétrotranscription des ARNm extraits à l'aide du kit Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis® (ThermoScientific). Pour ce faire, 1µg d'ARNs totaux (qsp 11µL H₂O) est incubé avec 1µL d'amorces oligo(dT)₁₈ (0,5µg/µL) pendant 5 minutes à 65°C pour que ces amorces puissent s'hybrider à la queue poly-A des ARNm. Un mélange réactionnel de 8µL composé de 4µL de tampon de réaction 5X, 1µL de RiboLock RNase Inhibitor (20U/µL), 2µL de dNTP (10mM) et 1µL d'enzyme RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/µL) est ensuite ajouté et la synthèse d'ADNc est effectuée à 42°C pendant 1 heure. 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 avec une RNase H (ThermoScientific) de 20 minutes à 37°C est entrepris. Ainsi, 2,5µL de tampon de réaction 10X, 0,2µL de RNase H (5U/µL) et 2,3µL d'H₂O sont ajoutés. Enfin, une incubation de 10 minutes à 65°C permettant l'inactivation de la RNase H est effectuée. Les ADNc ainsi obtenus sont stockés à -20°C.

2.2.2. Amplification des fragments spécifiques par PCR

Pour obtenir les fragments spécifiques d'intérêt qui permettront la production des dsRNA-Pamea7.1, dsRNA-Pamea7.2, dsRNA-Pameβ1, dsRNA-Apisumβ2, dsRNA-ApisumAChE1 et dsRNA-LacZ, une amplification par PCR est réalisée à partir des plasmides pCR-blunt/Pameβ1 et pCR-blunt/Pamea7 ou d'ADNc de puceron adulte. Les couples d'amorces spécifiques utilisés sont indiqués dans le tableau 21. Chaque amorce contient en amont un promoteur bactérien T7. Les amplifications sont réalisées à l'aide de l'ADN polymérase haute-fidélité KOD Hot Start™ (Novagen) selon le mélange réactionnel suivant : 2µL d'ADN polymérase KOD (1U/µL), 10µL de tampon KOD (10X), 10µL de dNTP (2mM), 6µL de MgSO₄ (10mM), 6µL d'amorces sens et antisens (10µM), 10µL de plasmide pCR-blunt correspondant (10ng/µL) ou d'ADNc de puceron dilué au 1/5^e et d'H₂O qsp 100µL. La réaction débute par une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes suivie de 30 cycles successifs composés d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, d'une étape d'hybridation à la température indiquée dans le tableau 21 et d'une étape d'élongation à 70°C pendant 10 secondes. Enfin, une étape d'élongation finale est réalisée à 70°C pendant 7 minutes. Les produits de PCR ainsi obtenus sont conservés à -20°C.

dsRNA	Séquence 5' → 3'	Température (°C)
dsRNA-Pamea7.1	Sens : TAATACGACTCACTATAGGGATGGAGTCAACAGCAGCCTC Antisens : TAATACGACTCACTATAGGGGACAAATGCATATGCAGACG	60
dsRNA-Pamea7.2	Sens : TAATACGACTCACTATAGGGCGCCACACGCATCACGAGG Antisens : TAATACGACTCACTATAGGGGGTTAGTTCGCGGTGGGGGC	60
dsRNA-Pameβ1	Sens : TAATACGACTCACTATAGGGCCGCCGACCCCTCGTACGG Antisens : TAATACGACTCACTATAGGGGGTCCGACAGCTCCATCACC	60
dsRNA-Apisumβ2	Sens : TAATACGACTCACTATAGGGTAGATGCTGCAATAACAGAC Antisens : TAATACGACTCACTATAGGGGAGTGTCTATCGTAGAACCTC	45
dsRNA-ApisumAChE1	Sens : TAATACGACTCACTATAGGGGTCTGACAAAACTGTACAA Antisens : TAATACGACTCACTATAGGGTAACATCAAACGACAGTTG	45
dsRNA-LacZ	Sens : TAATACGACTCACTATAGGGATGACCATGATTACGCCAAG Antisens : TAATACGACTCACTATAGGGTGGCGGCCGTTACTAGTGGGA	60

Tableau 21 : Séquences des amorces utilisées pour la synthèse des dsRNAs ainsi que la température utilisée pour l'étape d'hybridation. La séquence du promoteur bactérien T7 est indiquée en rouge.

2.2.3. Extraction sur gel et purification des amplicons

Après la migration électrophorétique des produits de PCR dans un gel d'agarose 2% supplémenté en bromure d'éthidium (BET), les amplicons d'intérêt de 140pb qui correspondent au promoteur bactérien T7 de 20pb ajouté à chaque extrémité du fragment spécifique de 100pb, sont sélectionnés grâce à un marqueur d'échelle de poids moléculaire 50bp (Promega). Les bandes d'intérêt sont ensuite excisées du gel d'agarose, sous un banc UV, à l'aide d'une lame de scalpel avant d'être purifiées à l'aide du kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Après estimation du poids du morceau de gel d'agarose extrait, celui-ci est placé dans un bain-marie à 50°C en présence de tampon NT1 (200µL pour 100mg de gel). Une fois le gel complètement dissous, la suspension est filtrée dans une colonne qui contient une membrane de silice. Le tampon NT1 contient des sels qui permettent la fixation de l'ADN sur cette membrane. Après deux lavages successifs avec du tampon NT3 ainsi qu'une étape de séchage de la membrane, les amplicons sont élués dans 30µL d'H₂O. La quantité et la qualité des amplicons sont évaluées grâce à un spectrophotomètre UV (SimpliNano, Thermofisher) par la mesure de l'absorbance à 260nm et des rapports d'absorbance A₂₆₀/A₂₈₀ et A₂₆₀/A₂₃₀. Les ADN sont conservés à -20°C.

2.2.4. Transcription *in vitro*

Afin d'obtenir les dsRNAs d'intérêt, une réaction de transcription *in vitro* est réalisée grâce au promoteur bactérien T7 présent en aval et en amont des amplicons obtenus précédemment. Elle est réalisée avec le kit Megascript® T7 High Yield Transcription Kit (Invitrogen) selon le mélange réactionnel suivant : 800ng d'amplicons, 8µL de chaque nucléotide (ATP, CTP, GTP, UTP ; 75mM), 8µL de tampon de réaction (10X), 8µL d'enzyme T7 RNA polymerase et d'H₂O qsp 80µL. La réaction s'effectue à 37°C pendant 24h.

2.2.5. Purification des dsRNAs d'intérêt

Après 24h d'incubation, l'ADN utilisé comme matrice pour la production des dsRNAs d'intérêt est dégradé grâce à un traitement avec 4µL de TURBO DNase (2U) contenue dans le kit Megascript® T7 High Yield Transcription Kit (Invitrogen) pendant 15 minutes à 37°C. Ensuite, les produits de transcription sont purifiés à l'aide du kit Nucleospin® miRNA (Macherey-Nagel). Une fois que le volume des échantillons a été ajusté à 150µL, 150µL de tampon de lyse ML est ajouté. Puis, l'ajout d'éthanol absolu (200µL) permet d'ajuster les conditions de fixation des acides nucléiques afin de pouvoir les retenir par une membrane de silice. En effet, cette première filtration permet de retenir sur la membrane les éventuels longs acides nucléiques alors que les dsRNAs sont retrouvés dans l'éluat. Afin de s'assurer qu'aucun ADN ne soit encore présent, un deuxième traitement de la membrane de silice de 15 minutes à température ambiante avec une rDNase (100µL) est réalisé après avoir retiré les sels à l'aide du tampon MDB (350µL). Quant à l'éluat qui contient les dsRNAs, 100µL de tampon MP qui permet de précipiter les protéines et 800µL de tampon MX permettant d'ajuster les conditions de fixation pour les dsRNAs d'intérêt sont ajoutés. Après une deuxième filtration de l'éluat à travers la membrane de silice, deux lavages avec du tampon MW2 sont réalisés. Après un séchage de la membrane, les dsRNAs sont élués dans 50µL d'H₂O. Les dsRNAs sont ensuite dénaturés à 95°C pendant 5 minutes puis réhybridés à température ambiante pendant 1h30. La quantité et la qualité des dsRNAs sont évaluées grâce à un spectrophotomètre UV (SimpliNano, ThermoFisher) par la mesure de l'absorbance à 260nm et des rapports d'absorbance A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} . Les dsRNAs sont conservés à -20°C et sont utilisés dans les 2 mois qui suivent leur production.

3. Traitement des insectes avec les dsRNAs d'intérêt

Depuis les premières études visant à évaluer l'utilisation de l'ARNi comme outil de lutte contre les insectes ravageurs, différentes méthodes de traitement des insectes avec des dsRNAs ont été étudiées comme l'injection, l'application topique ou encore l'ingestion (Li *et al.*, 2011; Baum et Roberts; Niu *et al.*, 2019; Zhu et Palli, 2020). Cette dernière méthode a montré des résultats prometteurs mais inégaux selon les espèces d'insectes ciblées (Liu *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2013; Christiaens *et al.*, 2014). Cette variabilité des résultats est attribuée à l'instabilité des dsRNAs qui peut être due à leur faible absorption cellulaire par différents tissus et par leur dégradation par des nucléases présentes dans le tractus digestif de l'insecte (Christiaens et Smagghe, 2014; Wynant *et al.*, 2014; Cooper *et al.*, 2019; Zhu et Palli, 2020). Une étude récente chez la blatte *Blattella germanica* a démontré qu'encapsuler des dsRNAs dans des liposomes pour ainsi former des lipoplexes permettait de les protéger des nucléases et d'ainsi augmenter leur efficacité (Lin *et al.*, 2017). C'est pourquoi au cours de ce travail de thèse, les dsRNAs ont été délivrés sous forme de lipoplexes soit par ingestion aux blattes adultes *Periplaneta americana* et aux larves de puceron *Acyrtosiphon pisum* âgées d'un jour, soit par application topique aux pucerons adultes.

3.1. Traitement des blattes *Periplaneta americana* avec les dsRNAs d'intérêt par ingestion

Chaque blatte ingère 10µL d'une solution qui contient 250ng de dsRNA-Pameβ1, 500ng de dsRNA-Pameα7 ou des dsRNA-LacZ en quantité équivalente. La composition de ces solutions est détaillée dans le tableau 22. Après, un temps d'incubation de 30 minutes à température ambiante, l'ingestion se déroule selon la méthode de Huang *et al.*, 2018. La blatte, qui a été privée d'eau pendant 24h, est maintenue par les ailes et ingère les 10µL de la solution de lipoplexes contenant les dsRNAs d'intérêt qui lui sont présentés au niveau des pièces buccales à l'aide d'une pipette P10. La blatte est ensuite surveillée pendant quelques minutes supplémentaires afin de s'assurer qu'elle ne recrache pas la solution.

	Lipoplexes dsRNA-Pameα7	Lipoplexes dsRNA-Pameβ1	Lipoplexes dsRNA-LacZ
Agent de transfection Escort IV®	1µL	1µL	1µL
dsRNA-Pameα7.1 (0,1µg/µL)	2,5µL	-	-
dsRNA-Pameα7.2 (0,1µg/µL)	2,5µL	-	-
dsRNA-Pameβ1 (0,1µg/µL)	-	2,5µL	-
dsRNA-LacZ (0,1µg/µL)	-	-	2,5µL ou 5µL
Solution glucose 10%	qsp 10µL	qsp 10µL	qsp 10µL

Tableau 22 : Composition des solutions de lipoplexes contenant les dsRNAs d'intérêt qui sont ingérées par la blatte adulte *Periplaneta americana*.

3.2. Traitement des pucerons *Acyrtosiphon pisum* avec les dsRNAs d'intérêt

3.2.1. Traitement des pucerons adultes par application topique des dsRNAs d'intérêt

Pour évaluer l'utilisation des dsRNA-ApisumAChE1 et dsRNA-Apisumβ2 pour lutter contre le puceron du pois adulte, des pucerons adultes sont traités par application topique avec 400ng de dsRNAs d'intérêt. Pour ce faire, 1µL d'une solution de lipoplexes qui contient les dsRNAs d'intérêt est déposé sur chaque puceron adulte. Les compositions de ces solutions sont détaillées dans le tableau 23. Ces solutions sont incubées à température ambiante pendant 30 minutes avant d'être appliquées. Pour ce faire, des pucerons adultes sont isolés et collés sur une bande adhésive à l'aide d'un pinceau humidifié. Puis, avec une pipette P10, 1µL de solution contenant les lipoplexes est déposé sur la face dorsale de chaque puceron. Les pucerons adultes sont ensuite surveillés pendant 20 minutes afin de s'assurer que la solution est absorbée. Ils sont ensuite placés en système artificiel de nutrition.

	Lipoplexes dsRNA-ApisumAChE1	Lipoplexes dsRNA-Apisumβ2	Lipoplexes dsRNA-LacZ
Agent de transfection Escort IV®	0,1μL	0,1μL	0,1μL
dsRNA-ApisumAChE1 (2μg/μL)	0,2μL	-	-
dsRNA-Apisumβ2 (2μg/μL)		0,2μL	
dsRNA-LacZ (2μg/μL)	-	-	0,2μL
Tampon PBS (1X)	qsp 1μL	qsp1μL	qsp 1μL

Tableau 23 : Composition des solutions de lipoplexes contenant les dsRNAs d'intérêt qui sont appliquées sur la face dorsale des pucerons adultes *Acyrtosiphon pisum*.

3.2.2. Traitement des larves de pucerons par ingestion des dsRNAs d'intérêt

Enfin, pour évaluer l'utilisation des dsRNA-Apisumβ2 pour lutter contre le puceron du pois au stade larvaire, des larves âgées d'un jour ont ingéré des lipoplexes qui contiennent les dsRNAs d'intérêt. Pour obtenir des larves âgées d'un jour, des pucerons adultes femelles asexuées sont isolés et placés dans des systèmes artificiels de nutrition. Au bout de 24h, les larves pondues par ces femelles sont isolées et placées dans de nouveaux systèmes artificiels de nutrition. Dans ces derniers, les larves sont mises en présence de 200μL d'une solution nutritive qui contient les lipoplexes avec les dsRNAs d'intérêt à 200ng/μL. La préparation de ces solutions est détaillée dans le tableau 24.

	Lipoplexes dsRNA-Apisumβ2	Lipoplexes dsRNA-LacZ
Agent de transfection Escort IV® (dilué au 1/10^e)	1μL	1μL
dsRNA-Apisumβ2 (4,44μg/μL)	9μL	-
dsRNA-LacZ (4,44μg/μL)	-	9μL
Incubation de 30 minutes à température ambiante		
Solution nutritive	qsp 200μL	qsp 200μL

Tableau 24 : Composition des solutions de lipoplexes contenant les dsRNAs d'intérêt qui sont ingérées par les larves de puceron *Acyrtosiphon pisum* âgées d'un jour.

4. Evaluation de l'efficacité des dsRNAs d'intérêt

4.1. Quantification de l'expression des gènes d'intérêt par qPCR

Pour évaluer l'efficacité des différents dsRNAs, les niveaux d'expression des transcrits des gènes cibles sont mesurés par PCR quantitative (qPCR). Ces expérimentations permettent également d'évaluer l'impact de ces dsRNAs sur des gènes non-cibles. Cette quantification est réalisée à partir d'ADNc issus de la transcription inverse d'ARNs totaux provenant de 6 DGAs de blattes, de 10 larves de pucerons ou d'un puceron adulte.

4.1.1. Dissection des blattes *Periplaneta americana* et prélèvement du dernier ganglion abdominal

96h après l'ingestion des dsRNAs, les blattes sont disséquées sous une loupe binoculaire afin de récupérer le DGA qui contient les neurones DUM. Pour ce faire, les blattes sont placées pendant 30 minutes à 4°C afin de les anesthésier. Après avoir coupé la tête, les ailes et les pattes, deux incisions sont réalisées sur les côtés de l'abdomen de la blatte et la cavité abdominale est ouverte à l'aide d'une pince chirurgicale. 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 (LP) composé de NaCl (200mM), KCl (3,1mM), CaCl₂ (5mM), MgCl₂ (4mM), HEPES (10mM), et dont le pH est ajusté à 7,4.

4.1.2. Obtention des ADNc nécessaires à la quantification par qPCR

Les ARNs totaux issus de six DGAs provenant de blattes qui ont ingéré les dsRNAs d'intérêt sont extraits à 96h. Quant aux ARNs totaux provenant d'un puceron adulte ou de 10 larves de puceron traités avec les dsRNAs d'intérêt, leur extraction est réalisée 2h, 24h, 48h et 72h après le traitement avec les dsRNAs. Cette étape est réalisée à l'aide du kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel) dont le protocole est décrit dans la partie 2.2.1.a) du Matériels et méthodes. La quantité et la qualité des ARNs sont évaluées grâce à un spectrophotomètre UV (SimpliNano, ThermoFisher) par la mesure de l'absorbance à 260nm et des rapports d'absorbance A₂₆₀/A₂₈₀ et A₂₆₀/A₂₃₀ respectivement.

Si nécessaire, les échantillons sont concentrés et purifiés. Pour ce faire, les ARNs totaux extraits sont précipités pendant une nuit à -80°C en présence de glycogène (20µg), 0,1 volume d'acétate de sodium (3M) et deux volumes d'éthanol absolu. Après une centrifugation de 15 minutes à 15 000g (4°C), le culot d'ARN est lavé à deux reprises avec 200µL d'éthanol à 70% (centrifugation 15 minutes, 15 000g, 4°C) puis resuspendu dans 12µL d'H₂O. Enfin, la quantité et la qualité des ARN sont évaluées une nouvelle fois grâce à un spectrophotomètre UV (SimpliNano, ThermoFisher).

A l'aide du kit Revertaid H Minus First Strand cDNA Synthesis® (ThermoScientific), les ARNm extraits sont rétrotranscrits en ADNc selon le protocole détaillé dans la partie 2.2.1.b) du Matériels et méthodes. Cette étape de transcription inverse est réalisée à partir de 500ng d'ARN issus de DGA de blatte ou de 1µg d'ARN issus de larves de puceron ou de puceron adulte. Ensuite, un traitement avec une RNase H (ThermoScientific) a permis de dégrader les éventuels dimères ARN/ADN présents dans les échantillons. Les ADNc ainsi obtenus sont dilués au 1/10^e ou au 1/20^e et stockés à -20°C.

4.1.3. Analyse par qPCR de l'expression des gènes d'intérêt

A partir des ADNc issus des différents lots de blattes ou de pucerons aux stades larvaire ou adulte ayant reçu les dsRNAs, des expériences de qPCR sont réalisées afin d'évaluer leur impact sur l'expression des différentes sous-unités nicotiniques chez la blatte et le puceron ainsi que de l'acétylcholinestérase identifiée chez le puceron. Chaque réaction de qPCR est réalisée à l'aide d'un mélange réactionnel de 10 ou 20µL qui

présentent les mêmes rapports de quantité de réactifs utilisés. Par exemple, un mélange réactionnel de 10µL est composé de 5µL de tampon de réaction Takyon No Rox SYBR® Master Mix Blue dTTP (Eurogentec), 2µL d'amorces sens et antisens à 2,5µM (Pamea7 et Pameβ1) ou 10µM (Pamea1, Pamea2, Pamea3, Pamea4, Pamea6, Pamea8, Pameβ2, Pameβ3, Pameβ4, Pameβ5, Pameβ6, Pameβ8, Pameβ9, Pameactine, Apisuma1, Apisuma2, Apisuma3, Apisuma4, Apisuma6, Apisuma7, Apisuma8, Apisuma9, Apisuma10, Apisumβ1, Apisumβ2, ApisumAChE1, ApisumAChE2 et ApisumRPL7), 0,5µL d'H₂O et 2,5µL d'ADNc dilué au 1/10^e. La liste de toutes les amorces utilisées est indiquée dans le tableau 25. 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 indiquée dans le tableau 25, à l'exception de celle du niveau d'expression des sous-unités Pamea5, Pameβ3, Pameβ4 et Pameβ6 qui nécessite des cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de 10 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 20 secondes à 60°C suivie d'une étape d'élongation de 40 secondes à 72°C. 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. De plus, les efficacités des amorces utilisées ont été évaluées à l'aide d'une gamme de dilution d'ADNc et sont toutes comprises entre 95 et 105%. Toutes les réactions sont réalisées en duplicat et les valeurs seuils (Ct) sont normalisées avec un gène de référence codant pour l'actine pour les études réalisées sur la blatte ou RPL7 pour le puceron. 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 gènes d'intérêt est évaluée selon la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Espèce	Gène	Amorce sens (5'→3')	Amorce antisens (5'→3')	Température (°C)
<i>Periplaneta americana</i>	Pamea1	AGGACTCTGTGGAGGACGAG	CTCCCGGTAGAGGCAGTGGT	60
	Pamea2	TAACAACCTCCATCTCATGCC	GATCTTGCCACTCATGTTCC	60
	Pamea3	CGACACCTTCAGCATTTGTG	GCAGATGAACCCGCTAGACT	60
	Pamea4	GTGTTGATGCGTACAGTGAG	AGACAGGTCATCCTTTGTAG	60
	Pamea5	GTGTGAGAGGAACCGGTGTT	ATCCCCTTCGTTGTCTGCTG	60
	Pamea6	TGACCATCTTGCTCTCGT	CGACTCATTCCGAGAATC	60
	Pamea7	CAATTGCAAGACGACACC	ATGGAGGCGATGAGAACA	65
	Pamea8	ACGTGTTGTCGCACTTCA	TATCCGGAGGAACCTGGAAG	60
	Pamea9	ACCACGGTCGTCAATATCGG	CGCGAGACAATGGGTGTTTC	60
	Pameβ1	GGTGACCAAGTGCTCTTAG	ATGATTGCCCTCGTAGATG	65
	Pameβ2	AGGAGACGACGTGCCATTTT	TCCTCATGCAAGACAGGCAG	60
	Pameβ3	TCGTCGTCATTCTGCACTC	GCAGGACCCGCATATCATCA	60
	Pameβ4	CTTGCGGTGTTCAACCAGTG	CAGCTGACATCTCCTTGGCA	60
	Pameβ5	GAGAACACGAGGTGTCTGGT	CAGCTAGACGCGACAGAGAA	60
	Pameβ6	AGTCGCACAGTTTGCTACGA	AGGAGCAGTTCACCTTGTCTG	60
	Pameβ8	TGTTTCGATGGTTGCGGTGTA	TGTCGAGGTTGCAGACAACA	60
	Pameβ9	TCCGGACGTCTACTCCACAG	GACAACATCCACAGCTGCAA	60
Pameactine	GACTACTGGTATTGTGCTGG	AAAGCTGTAACCACGCTCAG	60	
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Apisuma1	GGTCATTGTCGGTCAGTTGG	ATTCCATTCTTGCTCGACCC	60
	Apisuma2	GGTCGTCACCATCATCATCA	CGTTCAACCTGGCCAAGTTA	60
	Apisuma3	GCGAGATTCACGGTCCAATA	CCATCGCCACATATTTCCAATC	60
	Apisuma4	CTCGTGAGACCAAGTGGTGAA	CATTTGCACGCCACCATACT	60
	Apisuma6	ACGTCGTCCTTGGCAAAGTT	TGCTGTAGCGTGATGCCAAA	60
	Apisuma7	GGCCAGTAGCTAATGAATCGG	TGTTGACCACCACGTTGGTT	60
	Apisuma8	ACCTCCGGCCATCTACAAAT	CGTTTAGATCAATGCCAACATC	60
	Apisuma9	ACGATCGACTGACATGGGAC	TGCGTGCATACGGCCAATA	60
	Apisuma10	GCACATGGTTCATAGCGAACT	CCACCGCTTCTGTTCAACAC	60
	Apisumβ1	CGCCGTCAAAACAAGAT	CATCGCTACGTACTTCCAGTC	60
	Apisumβ2	CGCAAAGACGAAGAGTCGAG	ACGGATAGCGTCAGGAACAC	60
	ApisumAChE1	ACAGTTCAGCGATGGTCGAG	ACGAGACACCACCACGTTTT	65
	ApisumAChE2	AGCTGGAAAGAGACGCCATT	ACACACCCATCCAATCACCC	65
	ApisumRPL7	ACGTAAAGAGCGCGTGAAGA	GGTTCACACCACGAATACGCA	60

Tableau 25 : Liste des amorces et des températures utilisées pour les expériences de qPCR.

4.2. Evaluation de l'effet des dsRNA-ApisumAChE1 sur l'activité enzymatique de l'AChE du puceron *Acyrtosiphon pisum*

4.2.1. Dosage de l'activité enzymatique de l'AChE selon la méthode d'Ellman

Pour évaluer l'effet d'une application topique de dsRNA-ApisumAChE1 sur l'activité enzymatique de l'AChE du puceron *Acyrtosiphon pisum*, un dosage d'Ellman (Ellman *et al.*, 1961) est entrepris. Il s'agit de la méthode spectrophotométrique la plus couramment utilisée pour évaluer l'activité enzymatique de l'AChE (de Almeida *et al.*, 2022). Elle consiste en l'ajout d'acétylthiocholine (ATC), un substrat de l'AChE, dans une suspension qui contient l'enzyme. L'ATC est ensuite hydrolysée pour former de l'acétate et de la thiocholine. Le groupement thiol de cette dernière va ensuite réagir avec le 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic Acid) ou DTNB pour produire du 5-Thio-2-nitrobenzoate ou TNB. Ce dernier composé présente une coloration jaune (figure 36). Ainsi, l'activité enzymatique de l'AChE est évaluée par la mesure de l'absorbance à 405nm d'un échantillon par spectrophotométrie.

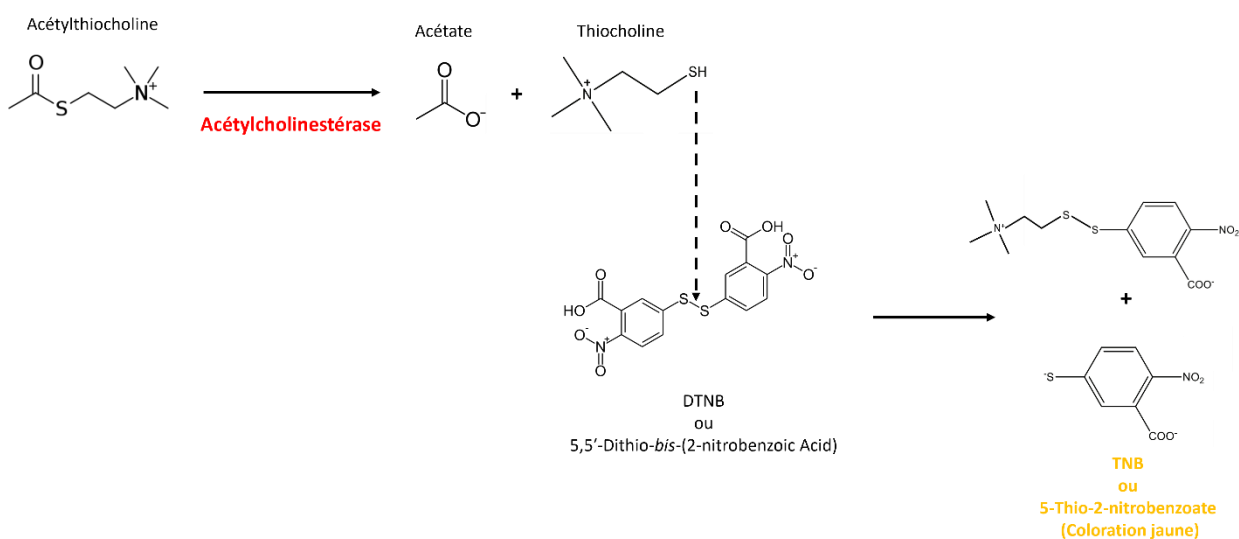


Figure 36 : Représentation schématique du principe de dosage de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase selon la méthode d'Ellman.

A 2h, 24h, 48h et 72h, des pucerons adultes traités avec les dsRNAs d'intérêt sont broyés dans du tampon PBS (6 pucerons pour 300µL de tampon PBS) à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax®. Ensuite, une centrifugation de 10 minutes à 5 000g à 4°C a permis d'isoler le surnageant qui contient les protéines. 90µL de ce surnageant dilué au tiers sont déposés dans une microplaque. Après l'ajout de 10µL de tampon PBS, la suspension diluée est mise en contact avec 100µL d'ATC iodure (Sigma-Aldrich) à 1mM et 100µL de DTNB (Sigma-Aldrich) à 1mM. À la suite d'une incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 405nm à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaque (Multiskan GO, Thermofisher). Chaque mesure est réalisée en triplicat. Les moyennes des absorbances obtenues sont corrigées avec le bruit de fond enregistré dans des puits sans ATC. De plus, les mesures de l'activité de l'ApisumAChE au sein d'une gamme de dilution du surnageant a permis de s'assurer que ces expérimentations ne se déroulaient pas en conditions saturantes.

4.2.2. Dosage protéique selon la méthode de Bradford

Afin de rapporter l'activité enzymatique de l'ApisumAChE mesurée à la quantité de protéines totales retrouvées dans les surnageants de pucerons adultes broyés, un dosage protéique est réalisé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Pour ce faire, 195µL de réactif de Bradford ou Bleu de Coomassie brillant G-250 (Sigma-Aldrich) sont ajoutés à 5µL du surnageant précédemment utilisé et dilué au 1/2. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 595nm à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaque (Multiskan GO, Thermofisher). Les mesures sont réalisées en triplicat et les moyennes sont corrigées avec le bruit de fond estimé dans des puits sans surnageant. En parallèle, des mesures d'absorbance de solutions d'albumine de sérum bovin à 0, 250, 500, 750, 1 000, 1 250 et 1 500ng/µL

selon le même protocole permettent d'obtenir la courbe étalon nécessaire à la détermination de la quantité de protéines dans les échantillons.

5. Evaluation de l'effet des dsRNAs d'intérêt comme bioinsecticide ou comme modulateur de l'efficacité d'un insecticide

5.1. Exposition des blattes *Periplaneta americana* à une dose sublétales d'imidaclopride

Un des objectifs de ce travail de thèse est d'évaluer l'utilisation des dsRNA-Pame β 1 pour contourner les phénomènes d'accommodation à l'IMI mis en place par la blatte *Periplaneta americana* après une exposition à une dose sublétales de cette insecticide. Pour ce faire, des blattes sont intoxiquées pendant 30 jours à une dose sublétales d'IMI selon le protocole décrit par Bantz *et al.*, (2022). Ainsi, une solution d'IMI (Sigma-Aldrich) à 0,3846 μ g/mL est préparée par la dilution en cascade d'une solution mère à 100mg/mL dans une solution de sucrose 10%. En considérant la consommation quotidienne d'eau de la blatte comme étant de 65 μ L, chaque blatte ingère 0,025 μ g/jour d'IMI ce qui correspond à la dose la plus forte de cet insecticide qui n'induit pas de mortalité chez la blatte. En parallèle, d'autres blattes ingèrent une solution de DMSO diluée dans une solution de sucrose 10% et serviront de contrôle.

5.2. Intoxication aiguë des insectes à l'imidaclopride

5.2.1. Intoxication aiguë des blattes *Periplaneta americana* adultes à l'imidaclopride

Pour évaluer l'effet des dsRNA-Pame β 1 sur la sensibilité des blattes accommodées à l'IMI, des expériences d'intoxication aiguë sont réalisées. Pour ce faire, 96h après l'ingestion de dsRNA-Pame β 1 ou de dsRNA-LacZ, les blattes accommodées sont intoxiquées avec de l'IMI à la dose létale 50 (DL₅₀) déterminée par Bantz *et al.*, (2022). Une solution d'IMI à 0,25mg/mL est préparée par la dilution en cascade d'une solution mère à 100mg/mL dans une solution de sucrose 10%. Chaque blatte ingère 10 μ L de cette solution, soit une dose de 2,5 μ g/blatte. Les intoxications aiguës se font par ingestion selon le protocole décrit dans la partie 3.1 du Matériels et méthodes. En parallèle, des lots de blattes traitées avec les dsRNAs d'intérêt ingèrent 10 μ L d'une solution contenant du DMSO diluée en quantité équivalente.

L'analyse quantitative des niveaux d'expression des sous-unités nicotiques de blattes accommodées à l'IMI a également mis en évidence une diminution d'expression de la sous-unité Pame α 7. Ainsi, un des objectifs de ce travail de thèse est d'évaluer l'implication de cette sous-unité dans la sensibilité de la blatte à l'IMI. Pour ce faire, des expériences d'intoxication aiguë à l'IMI sont réalisées selon le protocole décrit précédemment sur des blattes « naïves » qui ont ingéré des dsRNA-Pame α 7 ou des dsRNA-LacZ.

La mortalité est évaluée 48h après l'intoxication aiguë. Pour ce faire, une légère pression de quelques secondes est réalisée sur l'abdomen de la blatte. Si aucun mouvement n'est observé, la mort de l'insecte est validée.

5.2.2. Intoxication aiguë des pucerons *Acyrtosiphon pisum*, aux stades larvaire et adulte, à l'imidaclopride

Pour évaluer l'utilisation de dsRNA-Apisumβ2 combinés à l'IMI, des expériences d'intoxication aiguë à cet insecticide à la concentration létale 25 (CL₂₅) sont réalisées sur des larves de puceron *Acyrtosiphon pisum* âgées d'un jour mais également sur des adultes à la concentration létale 50 (CL₅₀). Ces deux doses ont été déterminées par l'établissement des courbes concentration-réponse en évaluant la mortalité après une intoxication aiguë à différentes concentrations d'IMI allant de 10⁻⁶µg/mL à 10µg/mL. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité corrigée selon la formule d'Abbott (Abbott, 1925) permettant de prendre en compte la mortalité des larves ou des adultes dans la condition contrôle :

$$\text{Mortalité corrigée (\%)} = \frac{(\%T - \%C)}{(100 - \%C)} * 100$$

Où **%T** est le pourcentage de mortalité induit dans la condition testée et **%C**, le pourcentage de mortalité dans la condition contrôle.

Les courbes de mortalité sont obtenues avec le logiciel GraphPad Prism (version 8.02, GraphPad Software) sous la forme d'une régression non linéaire et ajustées selon l'équation de Hill :

$$Y = m + \frac{M-m}{1+10^{(\log(CL_{50})-X)*nH}}$$

où **Y** est le pourcentage de mortalité observé à la valeur de concentration **X**, **m** et **M** sont respectivement les valeurs minimale et maximale de la courbe, **nH** est le coefficient de Hill.

Les CL₂₅ et CL₅₀ correspondent respectivement à la concentration d'IMI induisant 25% et 50% de mortalité à 72h. Pour les expériences d'intoxication réalisées sur les larves, une solution d'IMI (Sigma-Aldrich) à la CL₂₅ (0,002µg/mL) qui contient les dsRNA-Apisumβ2 ou les dsRNA-LacZ (200ng/µL) est préparée par la dilution en cascade d'une solution mère à 100mg/mL dans de la solution nutritive. Puis, 200µL de cette solution sont déposés dans un système artificiel de nutrition. Quant aux adultes, après l'application topique des dsRNAs d'intérêt (400ng), ils sont également placés dans un système artificiel de nutrition où ils sont mis en contact avec une solution nutritive contenant de l'IMI à la CL₅₀ (0,005µg/µL). La mortalité des insectes est évaluée à 24h et 72h. Pour s'assurer de la mort des pucerons, ces derniers sont placés sur leur face dorsale. Si aucun mouvement n'est observé au bout de quelques instants, ils sont considérés comme morts. Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité corrigée selon la formule d'Abbott (Abbott, 1925) décrite précédemment.

En parallèle, des lots de larves sont mis en contact avec une solution nutritive qui contient les dsRNAs d'intérêt et du DMSO dilué et les adultes, déjà traités avec les dsRNAs d'intérêt par application topique, avec une solution de DMSO diluée. Ces lots servent de contrôles et permettent également d'évaluer l'effet des dsRNA-Apisumβ2 seuls sur la mortalité du puceron pour déterminer l'effet bioinsecticide du traitement.

5.3. Intoxication aiguë du puceron *Acyrtosiphon pisum* au pirimicarbe

Afin d'évaluer l'utilisation des dsRNA-ApisumAChE1 combinée à l'utilisation du pirimicarbe pour lutter contre le puceron *Acyrtosiphon pisum*, des expériences d'intoxication aiguë à cet insecticide à la CL₅₀ couplée à l'application de dsRNAs sont réalisées sur des pucerons adultes. Pour ce faire, une courbe concentration-réponse a été établie grâce à des expériences d'intoxication aiguë au pirimicarbe réalisées sur des larves de pucerons. Cette courbe a été établie selon le protocole décrit dans la partie 5.2.2 du Matériels et méthodes avec une concentration de pirimicarbe allant de 10⁻⁹M à 10⁻⁴M. Ces données permettront, par la suite, d'évaluer l'utilisation combinée des dsRNA-ApisumAChE1 et du pirimicarbe.

6. Evaluation de l'impact de l'ingestion de dsRNA-Pamea7 sur la réponse calcique des nAChRs de blatte

Le développement de nouvelles stratégies de gestion durable des phénomènes d'accommodation aux insecticides passe par la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans leur mise en place. Une étude précédente réalisée au laboratoire SiFCIR a montré, sur un modèle de blattes accommodées, que cette accommodation pouvait être associée à une modification d'expression des sous-unités nicotiques et notamment celle de la sous-unité Pamea7 qui est diminuée (A. Bantz, données non publiées). L'un des objectifs de ce travail est d'évaluer l'impact de l'ingestion de dsRNA-Pamea7 sur la réponse calcique des nAChRs de blatte afin de déterminer si la diminution d'expression de la sous-unité Pamea7 observée chez les blattes accommodées (Bantz, 2020) entraîne des modifications des voies de signalisation calcique qui pourraient être impliquées dans la sensibilité des cibles moléculaires aux insecticides et qui pourraient, à plus long-terme, présenter un intérêt comme cible de l'ARNi. Ainsi, dans un premier temps, l'objectif est de déterminer s'il existe des nAChRs perméables au calcium sur les neurones DUM retrouvés dans le DGA de blatte et d'évaluer leur sensibilité à l' α -bgt, puis d'évaluer si cette réponse calcique est impactée par l'utilisation de dsRNA-Pamea7 grâce à la technique d'imagerie calcique.

6.1. Principe de la technique d'imagerie calcique

La technique d'imagerie calcique permet de visualiser et de quantifier les variations de la concentration intracellulaire de calcium. Ces variations au sein des neurones DUM de blatte sont suivies grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente chimique, le Fura-2 (Courjaret *et al.*, 2003; Gautier *et al.*, 2008; Benzidane *et al.*, 2017; Moreau *et al.*, 2020). Le Fura-2 est une molécule hydrosoluble en raison de la présence de charges négatives et ne peut donc pas traverser les membranes cellulaires. C'est pourquoi, elle peut être délivrée sous une forme complexée à un groupement acétoxyméthylester ou AM (Fura-2AM, Sigma-Aldrich) qui permet de neutraliser ces charges. Cette forme liposoluble qui peut pénétrer facilement les membranes cellulaires est ensuite clivée sous sa forme hydrosoluble par des estérases cytosoliques, libérant des groupements carboxyliques dont les ions d'oxygène électronégatifs permettent la fixation d'ions calcium. Le Fura-2 est une sonde dite double excitation/mono-émission. En effet, sous sa forme libre, elle est excitée à 380nm, et sous sa forme liée aux ions calcium, à 340nm. Dans les deux cas, la longueur d'onde d'émission à laquelle la

fluorescence est mesurée est de 510nm (figure 37A). C'est en calculant le rapport entre les fluorescences émises à la suite d'une excitation à 340nm et 380nm (ratio 340nm/380nm) que l'évolution de la concentration intracellulaire en calcium peut être évaluée au sein d'un neurone DUM isolé de blatte (figure 37B).

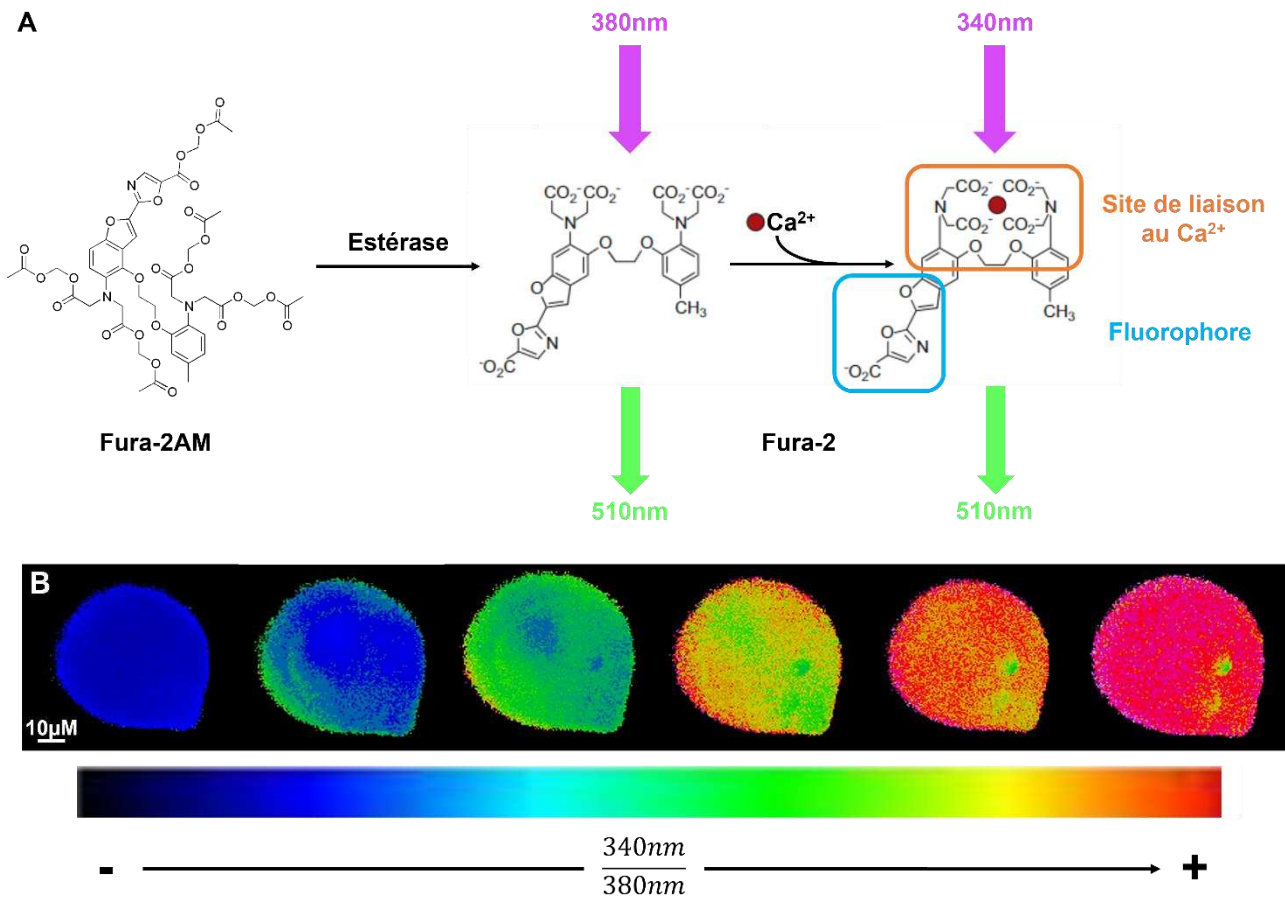


Figure 37 : Principe de la technique d'imagerie calcique. (A) Représentation schématique de l'utilisation de la sonde fluorescente Fura-2 pour l'évaluation de la variation de la concentration calcique intracellulaire. (B) Visualisation de la variation de la concentration en calcium intracellulaire d'un neurone DUM de blatte grâce au suivi du ratio 340nm/380nm et à l'ajout de pseudo-couleurs par le logiciel Imaging Workbench 6.0 (Indec BioSystems).

6.2. Mise en culture à court terme des neurones DUM de blatte

Dans un premier temps, des lamelles de verre sont préparées en appliquant 500µL de Poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) pendant au moins 5 minutes. Ce composé permet l'adhésion des neurones DUM à la lamelle de verre par la création de liaisons électrostatiques avec la membrane cellulaire. Puis, deux rinçages sont effectués avec un milieu composé de LP sucré (200mM NaCl, 3,1mM KCl, 5mM CaCl₂, 4mM MgCl₂, 10mM HEPES et 50mM sucrose, pH=7,4) et d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline à 100UI/mL et streptomycine à 100µg/mL, Sigma-Aldrich). Parallèlement, les blattes sont disséquées pour en extraire leur DGA selon le protocole décrit dans la partie 4.1.1 du Matériels et méthodes. Ces derniers sont alors incubés pendant 35 minutes dans une

solution de collagénase de type 1 à 1,1mg/mL (Worthington) à 29°C. Après un rinçage, les DGAs sont déposés dans 1mL de milieu de survie provenant d'une solution composée de 4mL de LP sucrés, 20µL d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine, Sigma-Aldrich) et 200µL de sérum de veau fœtal (Invitrogen). Ensuite, les neurones DUM sont dissociés mécaniquement par aspiration/refoulement à l'aide de trois pipettes Pasteur présentant des diamètres de tailles décroissantes. La suspension cellulaire obtenue est ensuite appliquée sur les lamelles préparées antérieurement qui sont ensuite placées dans un incubateur à 29°C pendant 24h dans des boîtes de Pétri pour éviter leur dessèchement et d'éventuelles contaminations.

6.3. Enregistrement de la concentration intracellulaire calcique basale d'un neurone DUM isolé

Après 24h d'incubation, les lamelles de verre sur lesquelles sont fixés les neurones DUM sont d'abord rincées deux fois avec du LP sucrés. Elles sont ensuite immergées dans une solution contenant 1µL de sonde fluorescente Fura-2AM à 10mM (Sigma-Aldrich), 20µL d'acide pluronique 10% (Sigma-Aldrich) et 2mL de LP sucrés. Elles sont alors incubées à 37°C et à l'obscurité pendant une heure. Puis, trois rinçages avec du LP d'enregistrement (200mM NaCl, 3,1mM KCl, 5mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 10mM HEPES) sont effectués. Les lamelles sont montées sur une chambre d'enregistrement avant d'être installée sur la platine d'un microscope inversé à épifluorescence (Nikon Eclipse Ti). Un neurone DUM isolé est sélectionné à l'objectif X20 et l'enregistrement est réalisé avec un grossissement X40. Lors d'un enregistrement, les longueurs d'onde d'excitation sont produites par un système d'illumination (Sutter lambda DG-4) comprenant une roue à filtres (Semrock) qui permet la sélection des différentes longueurs d'onde d'excitation. Les neurones DUM sont excités par l'alternance toutes les 100ms de deux rayonnements avec une longueur d'onde respective de 340nm et 380nm. Quant à la fluorescence émise à 510nm en réponse à cette excitation, elle est sélectionnée à l'aide d'un miroir dichroïque avant d'être captée par une caméra (Hamamatsu orca-R2-C10600). Les données sont analysées à l'aide du logiciel Imaging Workbench 6.0 (Indec BioSystems) qui permet d'obtenir une image des cellules en termes de ratio 340nm/380nm. A l'état basal, un neurone DUM viable présente un ratio 340nm/380nm d'environ 0,2.

6.4. Préparation des solutions perfusées

La chambre d'enregistrement est directement reliée à un système automatisé (Warner Instruments) qui permet l'application des différentes solutions testées. Pour isoler la réponse calcique à la NIC des nAChRs issus de blattes « naïves » ou traitées avec des dsRNAs (dsRNA-LacZ ou dsRNA-Pamea7) en imagerie calcique, un bloqueur de canaux calciques dépendants du potentiel, le chlorure de cobalt (CoCl₂, Sigma-Aldrich) est utilisé. Il est préparé par la dilution en cascade d'une solution mère à 10⁻¹M dans du LP d'enregistrement pour être utilisé à 3.10⁻³M. Cette solution de CoCl₂ est perfusée en continu dans la chambre d'enregistrement contenant la lamelle de verre avec les neurones DUM. Une fois que les neurones DUM ont été en contact de la solution de CoCl₂ pendant au moins 3 minutes, une solution de NIC à 10⁻⁵M (Sigma-Aldrich) est appliquée pendant 30 secondes. Cette dernière a été préparée par la dilution en cascade d'une solution mère à 10⁻¹M dans le LP d'enregistrement additionné de CoCl₂ à 3.10⁻³M décrit précédemment afin de s'assurer que les cellules soient toujours en contact du bloqueur. Quant à l'évaluation de la sensibilité des nAChRs perméables au calcium à l'a-

bgt, elle est permise grâce à l'utilisation de cette toxine à $5.10^{-7}M$ dans les différentes solutions décrites précédemment.

7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques concernant les expériences de qPCR, des tests toxicologiques, du dosage de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase ainsi que la variation de la réponse calcique des neurones DUM médiée par la NIC ont été réalisées selon un test non paramétrique de Mann-Whitney. Ces analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.02, où les valeurs de p inférieures à 0,05 sont considérées comme significatives (ns : non-significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Résultats

Etude 1 : Utilisation des dsRNAs ciblant la sous-unité nicotinique divergente $\beta 2$ pour lutter contre le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* aux stades larvaire et adulte

1. Synthèse de l'article

Aujourd'hui, la lutte contre les insectes ravageurs est encore principalement basée sur l'utilisation d'insecticides neurotoxiques comme les néonicotinoïdes, tels que l'IMI. En effet, ces derniers sont notamment efficaces sur un spectre large d'insectes nuisibles comme les diverses espèces de pucerons, telles que le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* (Elbert *et al.*, 2008), qui est le ravageur principal des cultures de fabacées. Cependant, les stratégies de lutte qui se basent sur l'utilisation de tels composés sont aujourd'hui décriées notamment à cause de leurs effets délétères sur des organismes non-cibles comme les insectes bénéfiques. En effet, de manière générale, la diminution de la population d'abeille *Apis mellifera* a été reliée à l'utilisation d'insecticides (Steinhauer *et al.*, 2018). En ce sens, il est devenu nécessaire de développer des stratégies de lutte alternatives ou des stratégies permettant de diminuer les doses d'insecticides utilisées en champ afin de limiter leur impact sur les organismes non-cibles. Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, l'ARNi est aujourd'hui considérée comme l'une des nouvelles stratégies prometteuses pour lutter spécifiquement contre une espèce d'insectes ravageurs (Christiaens *et al.*, 2020). Sa spécificité est directement liée à la spécificité de la séquence cible. L'identification des familles de gènes qui codent pour les sous-unités nicotiniques et l'analyse comparative de leur séquence protéique a permis de regrouper les sous-unités nicotiniques en deux groupes : les sous-unités nicotiniques conservées qui présentent au moins 60% d'identité de séquence entre elles et les sous-unités divergentes qui présentent un pourcentage d'identité inférieur à 30% avec les autres sous-unités nicotiniques (Jones et Sattelle, 2010). Il a été suggéré que ces sous-unités divergentes présenteraient un rôle spécifique pour une espèce d'insecte donnée. Chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*, trois sous-unités nicotiniques divergentes ont été identifiées : Apisuma9, Apisuma10 et Apisum $\beta 2$ (Dale *et al.*, 2010). Ainsi, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'utilisation de dsRNAs qui ciblent la sous-unité nicotinique divergente Apisum $\beta 2$ (dsRNA-Apisum $\beta 2$ ou dsRNA- $\beta 2$ dans l'article) pour lutter contre le puceron du pois aux stades larvaire et adulte.

Dans un premier temps, nous avons démontré par qPCR que les dsRNA-Apisum $\beta 2$ permettaient de diminuer l'expression de la sous-unité Apisum $\beta 2$ 2h après le traitement chez la larve et l'adulte. De manière intéressante, des modifications d'expression d'autres sous-unités nicotiniques après l'application de dsRNA-

Apisum β 2 ont été rapportées chez l'adulte suggérant la mise en place d'un phénomène de compensation de la diminution d'expression de la sous-unité Apisum β 2 par des modifications du profil d'expression des autres sous-unités nicotiques. Dans un second temps, l'évaluation du taux de mortalité des pucerons traités avec les dsRNA-Apisum β 2 a permis de mettre en évidence que ces derniers présentent un effet insecticide sur les larves et les adultes. De plus, l'utilisation combinée des dsRNA-Apisum β 2 et de l'IMI a permis de démontrer que ces deux molécules présentent des effets additifs suggérant que les dsRNAs d'intérêt n'altèrent pas l'efficacité de l'insecticide. Ainsi, les dsRNA-Apisum β 2 pourraient être envisagés comme agent de biocontrôle du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* ou bien être combinés à l'utilisation de l'IMI pour en réduire les doses appliquées en champs. Enfin, des expériences d'intoxication aiguë sur des abeilles *Apis mellifera* avec les dsRNA-Apisum β 2 seuls ou couplés à l'IMI à des concentrations induisant de la mortalité chez les pucerons a démontré que, dans ces conditions, la survie des abeilles n'est pas impactée.

Ainsi, nous avons démontré pour la première fois, que cibler une sous-unité nicotinique divergente par la technique d'ARNi pourrait être une stratégie efficace pour lutter contre des espèces d'insectes ravageurs tout en épargnant les insectes bénéfiques comme l'abeille *Apis mellifera*.

2. Article publié

Cette étude a fait l'objet d'une publication en premier auteur dans le journal à comité de lecture international *Pest Management Science*.

Use of double-stranded RNA targeting β 2 divergent nicotinic acetylcholine receptor subunit to control pea aphid *Acyrtosiphon pisum* at larval and adult stages.

Ligonniere, S., Raymond, V., & Goven, D. (2023)

Pest management science, DOI : 10.1002/ps.7820.

Use of double-stranded RNA targeting $\beta 2$ divergent nicotinic acetylcholine receptor subunit to control pea aphid *Acyrtosiphon pisum* at larval and adult stages

Sebastien Ligonniere,  Valerie Raymond*  and Delphine Goven 



Abstract

BACKGROUND: In recent years, the use of the RNA interference technology (RNAi) has emerged as one of the new strategies for species-specific control of insect pests. Its specificity depends on the distinctiveness of the target gene sequence for a given species. In this work, we assessed in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (*A. pisum*) the use of a double-stranded RNA (dsRNA) that targets the $\beta 2$ divergent nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunit (dsRNA- $\beta 2$), which shares low sequence identity with other subunits, to control populations of this pest at different developmental stages. Because nAChRs are targeted by neonicotinoid insecticides such as imidacloprid, we also assessed the effect of dsRNA- $\beta 2$ coupled to this insecticide on aphid survival. Finally, because the effect of a control agent on beneficial insect must be considered before any use of new pest management strategies, the acute toxicity of dsRNA- $\beta 2$ combined with imidacloprid was evaluated on honeybee *Apis mellifera*.

RESULTS: In this work, we demonstrated that dsRNA- $\beta 2$ alone has an insecticidal effect on aphid larvae and adults. Moreover, dsRNA- $\beta 2$ and imidacloprid effects on aphid larvae and adults were additive, meaning that dsRNA- $\beta 2$ did not alter the efficacy of imidacloprid on these two developmental stages. Also, no obvious acute toxicity on *Apis mellifera* was reported.

CONCLUSION: Using RNAi that targets $\beta 2$ divergent nAChR subunit is effective alone or combined with imidacloprid to control *A. pisum* at larval and adult stages. Because no obvious *Apis mellifera* mortality has been reported, this RNAi-based pest management strategy should be considered to control insect pest.

© 2023 The Authors. *Pest Management Science* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society of Chemical Industry. Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: RNA interference; divergent nicotinic acetylcholine receptor subunit; *Acyrtosiphon pisum*; imidacloprid; *Apis mellifera*; pest control

1 INTRODUCTION

According to the United Nations, the world population exceeded eight billion in 2022¹ meaning that the population has tripled in less than a century. As a consequence, producing enough food is now, more than ever, a major economic, health and social concern. Increasing agricultural yields by protecting crops against insect pests is still mainly based on neurotoxic insecticide use.² Neonicotinoids are one of the most important classes of insecticides globally because of their versatility of use and their high efficacy against a wide range of important insect pests such as aphids,³ like *Acyrtosiphon pisum* (*A. pisum*), which are the main pests of legume crops. Neonicotinoids are registered in more than 120 countries worldwide⁴ and among them, imidacloprid was the top-selling insecticide for many years.⁵ However, insecticide-based crop protection strategies are currently raising questions. Indeed, negative effects on beneficial insects such as development⁶ or behavioural⁷ impairments of the honeybee *Apis mellifera* have been linked to neonicotinoid exposure. More generally, the

decline of the honeybee population has also been linked to the use of insecticides.⁸ In this context, it is crucial to optimize the use of insecticides to limit their effects on non-target organisms such as beneficial insects, like honeybees known as environmental sentinels, or to develop new insect pest management strategies to allow a safer and more sustainable agriculture.

RNA interference (RNAi) is one of the most promising new strategies to control insect pest populations in a more species-specific way.⁹ RNAi is a highly conserved cellular mechanism of gene expression regulation at the post-transcriptomic level triggered by double-stranded RNA (dsRNA). Its specificity is directly linked to the target sequence specificity for a given insect species. In insects, RNAi is mainly responsible for antiviral responses¹⁰

* Correspondence to: V Raymond, Univ Angers, INRAE, SIFCIR, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France. E-mail: valerie.raymond@univ-angers.fr

Univ Angers, INRAE, SIFCIR, SFR QUASAV, Angers, France

meaning that it can be triggered by exogenous dsRNA. Once exogenous dsRNA has entered the cell, it is cleaved into short-interfering RNA (siRNA), typically 19–21 nucleotides long, by a RNase III endonuclease, Dicer 2. Dicer 2, with the help of dsRNA-binding proteins such as R2D2, facilitates transfer of the siRNA to the RNA-induced silencing complex (RISC). Within the RISC, the siRNA is unwound, and the passenger strand is eliminated, whereas the guide strand, complementary to the target messenger RNA (mRNA), is retained. Using the retained guide strand, the activated RISC complex recognizes target mRNAs, and Argonaute 2 protein within RISC cleaves the transcripts, thus silencing target gene expression.¹¹ Recently, the use of injected dsRNA targeting NADPH-cytochrome P450 reductase has proved to be effective as a biocontrol agent for *A. pisum*.¹² However, topical and oral application methods seem more suitable than injection in agriculture. Moreover, new strategies aimed at increasing RNAi efficacy have emerged, such as encapsulation of dsRNAs in a cationic liposome or nanocarrier to prevent their degradation by nucleases in the insect digestive tract.¹³ Thus, RNAi-based strategies through topical or oral application of dsRNAs could be an effective method in agriculture to control aphid populations such as *A. pisum*. Indeed, targeting proteins involved in neurotransmission in the aphid *Aphis gossypii*, such as synapsin, using topically applied encapsulated dsRNAs has proved to be effective in inducing mortality by itself or when coupled with a neonicotinoid.¹⁴ Hence, using RNAi targeting key proteins in the neurotransmission of *A. pisum* as a biocontrol agent could be a major strategy to control pea aphid populations and reduce the dose of insecticides such as neonicotinoids.

Neonicotinoids such as imidacloprid act mainly as nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists.¹⁵ The nAChRs are members of the Cys-loop ligand-gated ion channel superfamily.¹⁶ The nAChRs play a key role in insect physiology because they are involved in neurotransmission and mediate the fast actions of acetylcholine in the insect central nervous system. The nAChRs consist of five subunits arranged around a central ion channel. Subunits possessing two adjacent cysteine residues that are important for acetylcholine binding are defined as α subunits, whereas subunits lacking these vicinal cysteines are classified as β subunits.¹⁷ The *A. pisum* genome contains 11 genes encoding nAChR subunits: $\alpha 1$ – $\alpha 4$, $\alpha 6$ – $\alpha 10$, $\beta 1$ and $\beta 2$.¹⁸ Eight of the *A. pisum* nAChR subunits ($\alpha 1$ – $\alpha 4$, $\alpha 6$ – $\alpha 8$ and $\beta 1$) fall into core groups that are highly conserved with over 60% amino acid identity between different insect species.¹⁷ *A. pisum* also has three divergent nAChR subunits ($\alpha 9$, $\alpha 10$ and $\beta 2$) that show low sequence identity (20% or less) with other nAChR subunits.¹⁸ Because divergent nAChR subunits are specific for a given insect species, it has been suggested that these subunits may perform species-specific roles.^{17,18}

Because the specificity of RNAi is directly dependent on the specificity of the target sequence itself and the targeting gene involved in neurotransmission appears to be effective in controlling insect populations, the divergent nAChR subunits seem to be targets of choice for the development of pest control strategies using dsRNAs. Thus, in this study, our aim is to evaluate the use of dsRNAs targeting $\beta 2$ divergent nAChR subunit (dsRNA- $\beta 2$) of *A. pisum* as a biocontrol agent alone or combined with the neonicotinoid imidacloprid. First, we demonstrated by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) experiments that dsRNA- $\beta 2$ -treated larvae and adults of *A. pisum* show a decrease in $\beta 2$ subunit expression. We then demonstrated through toxicological studies that dsRNA- $\beta 2$ alone induces mortality in aphid larvae and

adults, and that it could be coupled with imidacloprid to effectively control an *A. pisum* population. Finally, an acute toxicity assay on honeybee *Apis mellifera* showed that *A. pisum* dsRNA- $\beta 2$ alone or coupled with imidacloprid at doses that can kill aphids has no acute toxicity effect on this beneficial insect. For the first time, we have demonstrated that targeting a divergent nAChR subunit using RNAi technology can induce mortality in an insect pest and can be used in combination with an insecticide to reduce the doses utilized on crops while sparing beneficial insects.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Insect rearing

A stable parthenogenetic population of pea aphid *A. pisum* was reared in our laboratory. They developed and fed on fava bean plants (*Vicia fabae*) that were placed in an artificial climate box set under the following environmental conditions: 20 °C and a photoperiod of 16 h light:8 h dark. Experiments were performed on 1-day-old larvae (L1) or aphids aged 10 days (adults).

2.2 dsRNA design

To design dsRNA that targets $\beta 2$ divergent nAChR subunit (accession number: XM_001945029.5) of *A. pisum*, called dsRNA- $\beta 2$, comparative analysis of the nucleic sequences coding for all the *A. pisum* nAChR subunits was carried out using Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A 100-bp specific fragment of the $\beta 2$ subunit coding sequence was selected outside consensus sequences (Supporting Information, Fig. S1). In parallel, control dsRNA was designed to target the bacterial β -galactosidase (dsRNA-control). The dsRNA sequences are shown in Table 1.

2.3 dsRNA synthesis

The dsRNAs of interest were obtained according to the protocol described by Bantz *et al.*¹⁹ First, we amplified a specific DNA fragment corresponding to the dsRNA- $\beta 2$ or dsRNA-control sequences. To do so, PCR analyses were performed using a high-fidelity Novagen™ KOD Hot Start DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) with the forward primer 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTAGATGCTGCAATAACAGAC-3' and the reverse primer 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGAGTG TCTATCGTAGAACCTC-3' for dsRNA- $\beta 2$ corresponding fragment amplification. For dsRNA-control, the forward primer 5'-TAATACGACTCACTATAGGGATGACCATGATTACGCCAAG-3' and the reverse primer 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTGGCG GCCGTACTAGTGGGA-3' were used. Each primer contains the T7 RNA polymerase promoter sequence (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). The PCR mix of 20 μ L consisted of 0.4 μ L of KOD

Table 1. Sequences of the double-stranded RNA (dsRNA).

	Sequence 5' → 3'	Length (bp)
dsRNA-control	AUGACCAUGAUUACGCCAAGCUAUU UAGGUGACGCGUUGAAUACUCUAAAG CUAUGCAUCAAGCUUGGUACCGAGC UCGGAUCCACUAGUAAACGGCCGCCA	100
dsRNA- $\beta 2$	UAGAUGCUGCAUUAACAGACAAUUA UGGGAACAACAUAUGGAACGACACG UGGACGGAUAAGCUGAGAAGAGAUU UAUUGAGGUUCUACGAUAGACACUC	100

DNA polymerase (1 U/ μ L), 2 μ L of KOD buffer (10 \times), 2 μ L of dNTP (2 mM), 1.2 μ L of MgSO₄ (10 mM), 1.2 μ L of forward and reverse primers (10 μ M), 2 μ L of complementary DNA (cDNA) of *A. pisum* adult or recombinant PCR™-Blunt II-TOPO® plasmid vector containing the β -galactosidase sequence and H₂O. This mix was submitted to an initial denaturation step at 95 °C for 2 min followed by 35 cycles of amplification (20 s at 95 °C, 20 s at 45 °C, 10 s at 70 °C) and a final extension step of 7 min at 70 °C. After electrophoretic migration of the PCR products in 2% agarose gel, the amplicons were extracted and purified using Nucleospin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions and quantified with the SimpliNano™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Then, an *in vitro* transcription reaction was performed using the MEGAscript T7 kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. The resulting transcripts were treated with DNase then purified with the NucleoSpin® miRNA kit (Macherey Nagel). Finally, the resulting dsRNAs were denatured at 95 °C for 5 min and re-hybridized at room temperature for 90 min. The dsRNAs were then stocked at –20 °C.

2.4 dsRNA treatment

A. pisum larvae were orally treated with the dsRNAs of interest. To do so, dsRNAs were encapsulated in cationic liposomes to prevent their degradation by nucleases in the aphid's digestive tract. One-day-old larvae were placed in a feeding apparatus as described by Sadeghi *et al.*²⁰ with 200 μ L of artificial diet containing dsRNAs at 200 ng/ μ L. This solution was prepared as follows: 9 μ L of dsRNA- β 2 or dsRNA-control (4.5 μ g/ μ L) were incubated for 30 min at room temperature with 0.1 μ L of Escort IV transfection reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 0.9 μ L H₂O. Then, 10 μ L of this solution was mixed with 190 μ L of artificial diet whose composition has been described by Febvay *et al.*²¹ Because dsRNAs can be applied topically but in this case controlling the dose of dsRNA applied to larvae is more difficult, we evaluated the effects of topically applied dsRNA- β 2 on adult aphids. At the same time, it allowed us to assess the effects of the dsRNAs of interest at a different developmental stage. In accordance with Niu *et al.*,²² adults were topically treated with 400 ng of dsRNAs. To do this, *A. pisum* adults were fixed on an adhesive surface. Then, 1 μ L of a solution containing 400 ng of dsRNA- β 2 or dsRNA-control was applied to the dorsal face of each aphid using a P10 micropipette. This solution was prepared as follows: 0.1 μ L

of dsRNA solution (4 μ g/ μ L) was incubated for 30 min at room temperature with 0.1 μ L Escort IV transfection reagent (Sigma-Aldrich) and phosphate-buffered saline. The dsRNA-treated adults were then placed in feeding apparatus containing 200 μ L of artificial diet.

2.5 Quantitative PCR experiments

To validate the efficacy of the dsRNA- β 2, qPCR experiments were performed to assess the relative expression level of nAChR subunits in aphid larvae and adults at 2, 24 and 72 h after their treatment with dsRNAs (dsRNA- β 2 or dsRNA-control). To do this, total RNAs of ten larvae or one adult were extracted using the Nucleospin® RNA kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's protocol. Then, 1 μ g of purified RNA was reverse transcribed using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis® kit (Thermo Fisher Scientific). After RNase H treatment (Thermo Fisher Scientific) for 20 min at 37 °C followed by an inactivation step at 65 °C for 10 min, the cDNAs were diluted 1:10 and stocked at –20 °C. Relative aphid mRNA nAChR subunit expression was quantified by qPCR on CFX Connect™ Real-Time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Each reaction was performed in duplicate and carried out in 10 μ L containing 2.5 μ L of diluted cDNA, 1 μ L of each primer set (10 μ M; Table 2), 5 μ L of 2 \times Takyon No Rox SYBR® Master Mix Blue dTTP (Eurogentec, Seraing, Belgique) and H₂O. The qPCR program consisted of a first step at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles comprising a denaturation step of 15 s at 95 °C and an annealing step of 20 s at 60 °C followed by an elongation step of 40 s at 72 °C. In qPCR reactions, the efficacy of each specific primers set was between 97% and 102%. To validate the specificity of each primer sets, melting curve analyses were carried out after the qPCR reactions. Relative mRNA expression levels of all the nAChR subunits on dsRNA-treated aphids were determined according to the 2^{– $\Delta\Delta$ Ct} method^{23,24} for which *RPL7* gene was used as the housekeeping gene.

2.6 dsRNA and insecticide assay

To determine the 25% and 50% lethal concentration values (LC₂₅ and LC₅₀) of imidacloprid (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) on *A. pisum*, a concentration–response curve was established through acute intoxication experiments. Briefly, larvae were placed in feeding apparatus with 200 μ L of artificial diet containing imidacloprid at different concentrations ranging from 10^{–6} to 10 μ g/mL. In parallel, control experiments were performed with

Table 2. Primer set sequences used for quantitative polymerase chain reaction experiments. The accession number of each gene is also indicated.

Gene	Accession number	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>RPL7</i>	NM_001135898.1	ACGTAAGAGCGCGTGAAGA	GGTTCACACCAGAATACGCA
α 1	XM_008182407.3	GGTCATTGTCGGTCAGTTGG	ATTCATTCTTGCTCGACCC
α 2	XM_008182417.3	GGTCGTCACCATCATCATCA	CGTTCAACCTGGCCAAAGTTA
α 3	XM_008187942.3	GCGAGATTACCGGTCCAATA	CCATCGCCACATATTTCCAATC
α 4	XM_029490651.1	CTCGTGAGACCAGTGGTGAA	CATTTGCACGCCACCATACT
α 6	XM_016809606.2	ACGTCGTCCTTGGCAAAGTT	TGCTGTAGCGTGATGCCAAA
α 7	XM_001945189.5	GGCCAGTAGCTAATGAATCGG	TGTTGACCACCACGTTGGTT
α 8	XM_001949983.5	ACCTCCGGCCATACAAAT	CGCTTAGATCAATGCCAACATC
α 9	XM_016807628.1	AGCATCGACTGACATGGGAC	TCCGCTGTATACGGCCAATA
α 10	XM_016807463.2	GCACATGGTTTCATAGCGAACT	CACCCGCTTCTGTTCAACAC
β 1	XM_029487953.1	CGCCGTCCAAACACAAGAT	CATCGTACTGACTTCCAGTC
β 2	XM_001945029.5	CGCAAAGACGAAGAGTCGAG	ACGGATAGCGTCAGGAACAC

artificial diet containing dimethylsulfoxide (DMSO), the solvent of imidacloprid. The mortality rate was assessed at 72 h. To do this, aphids that were not moving were removed from the feeding apparatus with a soft brush and placed on their backs. If no movement was observed after 2 min, death was confirmed. Results were expressed as percentage of corrected mortality using the following Abbott's formula²⁵:

$$\text{Corrected mortality (\%)} = \frac{(\%T - \%C)}{(100 - \%C)} \times 100$$

where %T is the percentage of mortality in the 'test' condition and %C is the percentage of mortality in the control condition.

Using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, Boston, MA, USA), LC₅₀ value was obtained from the mortality curve that was plotted as a nonlinear regression and fitted using the following Hill equation: $Y = m + \frac{M - m}{1 + 10^{(\log(LC_{50}) - X) \times nH}}$, where Y is the percentage of corrected mortality observed at a given concentration X , m and M are respectively the minimum and maximum values of the fitting curve and nH is the Hill coefficient. Using the same software, the LC₂₅ value was determined according to the following formula: $LC_{25} = \left(\frac{25}{100 - 25}\right)^{\frac{1}{nH}} \times LC_{50}$ where nH is the Hill coefficient. To evaluate the potential modulating effect of dsRNA- $\beta 2$ on the imidacloprid efficacy, acute intoxication to this insecticide coupled with dsRNA treatment was carried out. Shortly, the larvae were placed in a feeding apparatus with 200 μ L of artificial diet containing dsRNAs (dsRNA- $\beta 2$ or dsRNA-control) at 200 ng/ μ L and imidacloprid at LC₂₅ (2×10^{-3} μ g/mL). For adults, once the dsRNAs (400 ng) were typically applied, the aphids were also placed in a feeding apparatus with 200 μ L of artificial diet containing imidacloprid at a concentration close to LC₅₀ (5×10^{-3} μ g/mL). In parallel, control experiments were performed with dsRNA- $\beta 2$ or dsRNA-control treatment and artificial diet containing DMSO. At the same time, these conditions allowed us to evaluate the insecticidal activity of dsRNA- $\beta 2$ alone. Mortality rate was recorded at 24 and 72 h and expressed as percentage of corrected mortality using the Abbott formula described above. To determine the nature of the effect of dsRNA- $\beta 2$ on the imidacloprid efficacy, the results were also analyzed using the model deviation ratio (MDR) formula²⁶:

$$\text{MDR} = \frac{\text{Observed toxicity}}{\text{Expected toxicity}}$$

where the observed toxicity corresponds to the percentage of corrected mortality in aphids that ingested dsRNA- $\beta 2$ and were exposed to imidacloprid (dsRNA- $\beta 2$ + imidacloprid) and the expected toxicity corresponds to the sum of the percentages of corrected mortality obtained in aphids from each condition taken individually ('dsRNA- $\beta 2$ ' added to 'dsRNA-control + imidacloprid'). If the MDR is ≥ 1.3 , the effect is considered synergistic; if the MDR is ≤ 0.7 , the effect is antagonistic; and if the MDR is between 0.7 and 1.3, the effect is additive.

2.7 Toxicity assay on *Apis mellifera*

To evaluate the potential effects of dsRNA- $\beta 2$ alone or coupled with imidacloprid on honeybees *Apis mellifera*, toxicological experiments were performed to assess the acute oral and contact toxicity of these two molecules on bees. Those experiments were conducted based on Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) guidance document number 213 (acute oral toxicity studies to honeybees) and OECD guidance document

number 214 (acute contact toxicity studies to honeybees) by Tespapi (Allonnes, France). Briefly, in acute oral intoxication, bees ingested an average of 10 μ L of a syrup solution containing 400 ng of dsRNA- $\beta 2$ alone or added to imidacloprid at a concentration ranging from 10^{-5} to 2×10^{-1} μ g/mL. For acute contact intoxication, 1 μ L of a solution containing 400 ng of dsRNA- $\beta 2$ alone or with imidacloprid at a concentration ranging from 10^{-3} to 20 μ g/mL was typically applied on the bee's thorax. Mortality rate was assessed at 24 and 48 h and results were expressed as percentage of corrected mortality using the Abbott formula described previously.

2.8 Statistical analysis

For qPCR and toxicological experiments on *A. pisum*, results were statistically analyzed with non-parametric Mann-Whitney test performed using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software). For the toxicity assay on *Apis mellifera*, data were statistically analyzed using χ^2 test performed in Microsoft Excel® Software version 2016. Each statistical analysis was considered significant at * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

3 RESULTS

3.1 Effect of dsRNA- $\beta 2$ treatment on the expression level of nAChR subunits

First, we assessed the effect of dsRNA- $\beta 2$ on expression of the $\beta 2$ nAChR subunit of *A. pisum*. To do this, qPCR experiments were performed at 2, 24 and 72 h on larvae who fed on artificial diet containing dsRNAs (dsRNA-control or dsRNA- $\beta 2$) or on adults topically treated with dsRNAs. Two hours after dsRNA- $\beta 2$ treatment, the expression of the $\beta 2$ subunit was significantly decreased by approximately 35% in larvae (Fig. 1(A)) and 50% in adults (Fig. 1(B)). For larvae, no significant modification was observed at 24 and 72 h (Fig. 1(A)), whereas the observed decrease in expression was maintained in adults for at least 72 h. Indeed, expression of the $\beta 2$ subunit was also significantly reduced by 45% at 24 h and by 40% at 72 h (Fig. 1(B)). Thus, dsRNA- $\beta 2$ treatment effectively reduced the expression of the $\beta 2$ subunit in larvae and adults.

To assess the impact of the dsRNA- $\beta 2$ treatment on the expression of the other nAChR subunits ($\alpha 1-4$, $\alpha 6-10$ and $\beta 1$), we quantified their expression through qPCR experiments on dsRNA-treated aphids. Interestingly, no significant changes in non-target nAChR subunit expression was observed in dsRNA- $\beta 2$ -treated larvae compared with control (Supporting Information, Fig. S2). By contrast, for dsRNA- $\beta 2$ -treated adults, the expression of $\alpha 1-4$ and $\alpha 6-8$ nAChR subunits was significantly increased at 2 h compared with the dsRNA-control-treated adults whereas that of $\alpha 9$, $\alpha 10$ and $\beta 1$ nAChR subunits was not altered (Fig. 2(A)). No change in nAChR subunit expression was observed at 24 and 72 h (Fig. 2(B), (C)).

3.2 Acute toxicity of imidacloprid on *A. pisum*

To assess the acute toxicity of imidacloprid on *A. pisum*, a concentration-response curve was established through acute intoxication experiments. Larvae were placed in feeding apparatus with artificial diet containing imidacloprid at a concentration ranging from 10^{-6} to 10 μ g/mL. Mortality rate was assessed at 72 h (Fig. 3). From this mortality curve, we determined the LC₅₀ value ($4.61 \times 10^{-3} \pm 0.73 \times 10^{-3}$ μ g/mL). Using GraphPad software, we also determined the LC₂₅ value which is approximately 2×10^{-3} μ g/mL. In the next part of this work, we used

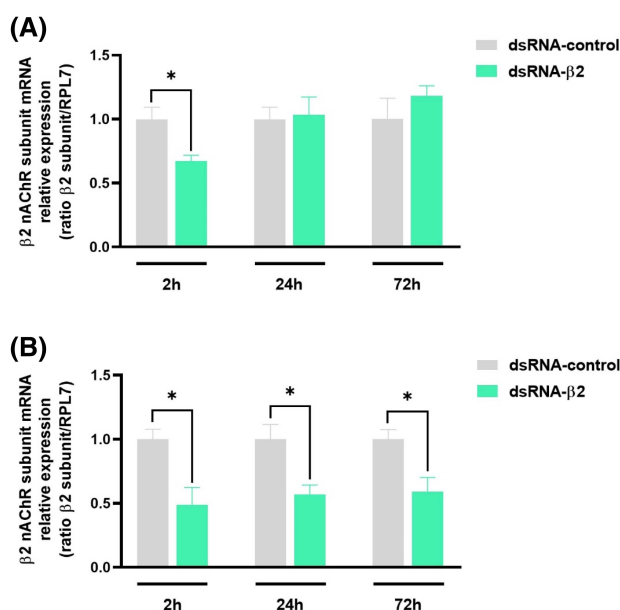


Figure 1. Effect of double-stranded RNA treatment (dsRNA-control or dsRNA- $\beta 2$) on $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunit messenger RNA expression level of *Acyrtosiphon pisum* (A) larvae and (B) adults. The quantitative polymerase chain reaction experiments were performed on ten larvae or one adult at 2, 24 and 72 h after dsRNA treatment. Data were normalized to the expression of the housekeeping gene *RPL7* with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Data are shown as the mean \pm SEM (* P < 0.05, non-parametric Mann–Whitney test; n = 4–6).

imidacloprid at concentrations close to the LC_{25} and LC_{50} values, which are 2×10^{-3} and 5×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively.

3.3 Effect of dsRNA- $\beta 2$ treatment on *A. pisum* survival

To assess the effect of dsRNA- $\beta 2$ alone or in combination with imidacloprid on *A. pisum* mortality at larval and adult stages, acute intoxication experiments with this insecticide coupled with dsRNA treatments were carried out. To do this, larvae fed on artificial diet containing dsRNAs (dsRNA-control or dsRNA- $\beta 2$) at 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ and imidacloprid or DMSO. Because preliminary results showed that dsRNA- $\beta 2$ combined with imidacloprid at 5×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$ killed all larvae and we aimed to describe the relationship between these two molecules, larvae were then exposed to imidacloprid at 2×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$. For adults, once 400 ng of dsRNAs were topically applied, they fed on artificial diet containing either imidacloprid at 5×10^{-3} $\mu\text{g}/\text{mL}$ or DMSO.

3.3.1 Evaluation of dsRNA- $\beta 2$ insecticidal activity on *A. pisum*

To evaluate the insecticidal activity of dsRNA- $\beta 2$, mortality rate was assessed 24 and 72 h after a treatment with dsRNAs (dsRNA- $\beta 2$ or dsRNA-control). Under these conditions, the aphids were not exposed to imidacloprid. At 24 and 72 h, the mortality rates of dsRNA- $\beta 2$ -treated larvae were significantly increased by 17% and 22% respectively, compared with dsRNA-control-treated larvae (Fig. 4(A), (B)). For adults, although no significant difference was observed at 24 h (Fig. 4(C)), a significant increase of 40% in mortality was reported 72 h after dsRNA- $\beta 2$ treatment compared with the control condition (Fig. 4(D)). Altogether, these results demonstrated that dsRNA- $\beta 2$ present an insecticidal effect on *A. pisum* at different developmental stages.

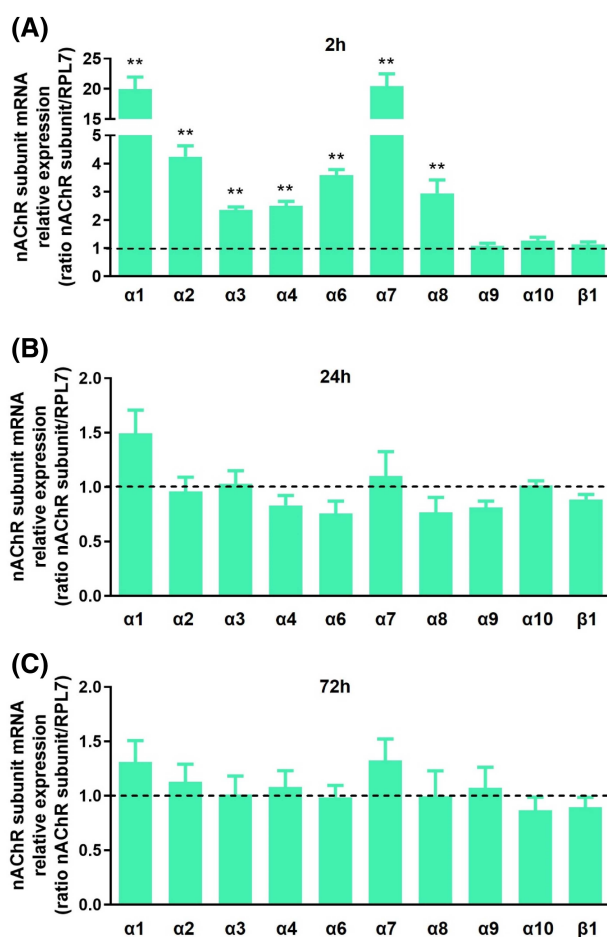


Figure 2. Effect of double-stranded RNA treatment (dsRNA-control or dsRNA- $\beta 2$) on other nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunit messenger RNA expression level of *Acyrtosiphon pisum* adults. The quantitative polymerase chain reaction experiments were performed on adults at (A) 2 h, (B) 24 h and (C) 72 h after dsRNA treatment. Data were normalized to the expression of the housekeeping gene *RPL7* with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The reference line corresponds to the dsRNA-control condition. Data are shown as the mean \pm SEM (** P < 0.01, non-parametric Mann–Whitney test; n = 4–6).

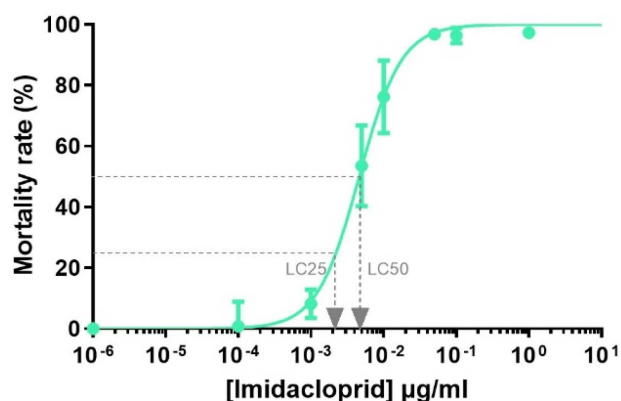


Figure 3. Mortality rate of *Acyrtosiphon pisum* larvae evaluated 72 h after acute intoxication with imidacloprid at concentrations ranging from 10^{-6} to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mortality rate is expressed as a corrected value according to the Abbott formula. Data are shown as the mean \pm SEM (n = 4–5).

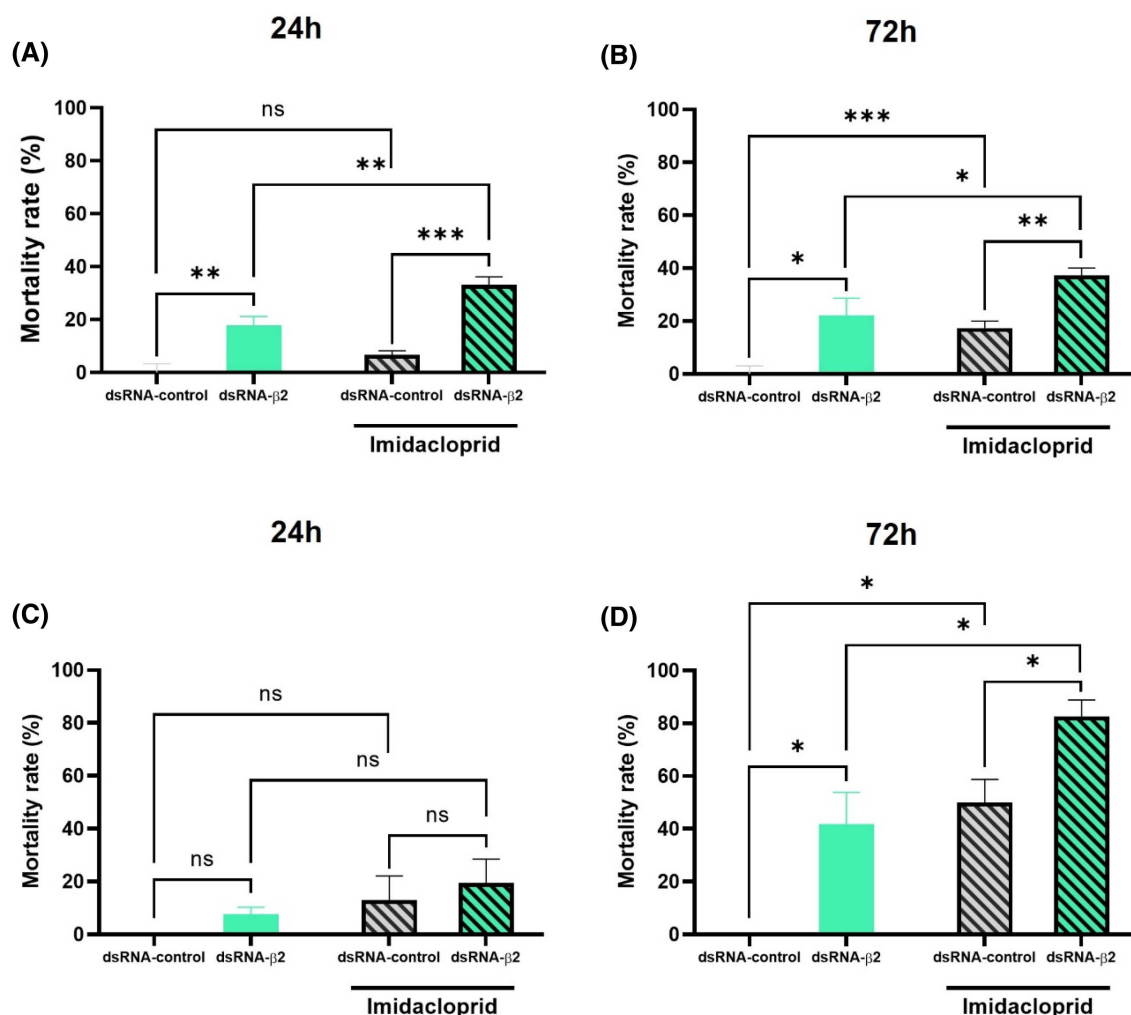


Figure 4. Effects of double-stranded RNA- $\beta 2$ (dsRNA- $\beta 2$) alone or combined with imidacloprid on *Acyrthosiphon pisum* mortality. Larvae fed on artificial diet containing 200 ng/ μ L of dsRNAs (dsRNA- $\beta 2$ or dsRNA-control) and imidacloprid at 2×10^{-3} μ g/mL or dimethylsulfoxide (DMSO). Mortality rates of larvae were assessed at (A) 24 h and (B) 72 h. Adults were topically treated with 400 ng of either dsRNA-control or dsRNA- $\beta 2$ and fed on artificial diet containing either imidacloprid at 5×10^{-3} μ g/mL or DMSO. Mortality rates were also assessed at (C) 24 h and (D) 72 h. Mortality rates are expressed as a corrected value according to the Abbott formula. Data are shown as the mean \pm SEM (ns, non-significant, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, non-parametric Mann-Whitney test; $n = 4-8$).

3.3.2 Effect of the combination of dsRNA- $\beta 2$ and imidacloprid on *A. pisum* survival

To assess the effect of dsRNA- $\beta 2$ on imidacloprid efficacy on *A. pisum*, mortality was assessed 24 and 72 h after dsRNA treatments (dsRNA- $\beta 2$ or dsRNA-control) and imidacloprid exposure. First, the mortality rate of larvae and adults treated with dsRNA-control and imidacloprid was significantly increased compared with the condition in which aphids were only treated with dsRNA-control. Indeed, at 72 h, imidacloprid exposure killed approximately 20% and 50% of larvae and adults respectively (Fig. 4(B), (D)), which is in agreement with the concentration-response curve presented above. Thus, we validated the effect of imidacloprid on *A. pisum* at larval and adult stages. At 24 and 72 h, the mortality rate of dsRNA- $\beta 2$ -treated larvae exposed to imidacloprid ('dsRNA- $\beta 2$ + imidacloprid') was, respectively, 33% and 37%, which was significantly higher than in the conditions in which dsRNA- $\beta 2$ ('dsRNA- $\beta 2$ ') and imidacloprid ('dsRNA-control + imidacloprid') effects were recorded separately (Fig. 4(A), (B)). For adults, mortality rates of 19% and 80% at 24 and 72 h

respectively were observed in the 'dsRNA- $\beta 2$ + imidacloprid' condition, but this was only significantly different from 'dsRNA- $\beta 2$ ' and 'dsRNA-control + imidacloprid' conditions at 72 h. Because the mortality rate recorded after the combined use of dsRNA- $\beta 2$ and imidacloprid was significantly different from the mortality observed after their separate use, for both larvae and adults at 72 h, the results can be analyzed according to the MDR. At 72 h, the calculated MDR is 0.95 for larvae and 0.90 for adults. Because the MDR is between 0.7 and 1.3, the relationship between dsRNA- $\beta 2$ and imidacloprid is additive. Thus, dsRNA- $\beta 2$ treatment did not alter the efficacy of imidacloprid and can be used to reduce insecticide doses.

3.4 Evaluation of acute toxicity of dsRNA- $\beta 2$ alone or coupled with imidacloprid on *Apis mellifera*

Because the impact of new pest management strategies or control agents on beneficial insects must be assessed before any application on crops, we assessed the potential oral or contact acute toxicity of dsRNA- $\beta 2$ alone or in combination with

imidacloprid on honeybee *Apis mellifera*. To do this, acute intoxications with dsRNA- $\beta 2$ at 400 ng were performed by oral or topical application. At the same time, the effect of these dsRNAs coupled to imidacloprid ranging in concentration from 10^{-5} to 2×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{mL}$ for oral toxicity assay and from 10^{-3} to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for contact toxicity was investigated. In all cases, the concentrations of imidacloprid previously used on *A. pisum* are within these concentration ranges. For oral (Table 3, Modality 1) and contact assay (Table 4, Modality 1), no induced mortality was reported after dsRNA- $\beta 2$ treatment alone. In the same way, no significant effect on bee survival was observed for all other imidacloprid concentrations when co-applied with dsRNA- $\beta 2$ (Table 3, Modality 2–5; Table 4, Modality 2–4). To ensure that the bees were sensitive to imidacloprid, they were exposed to a high dose of 2×10^{-1} $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the oral toxicity assay (Table 3, Modality 7) and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the contact toxicity assay (Table 4, Modality 6). In these conditions, mortality rates at 24 and 48 h were significantly higher than the control meaning that imidacloprid was effective on bees. Thus, these results suggest that dsRNA- $\beta 2$ alone or in combination with imidacloprid at concentrations that are effective against pea aphids does not present any obvious effect on bees' survival through oral or contact acute intoxication for at least 48 h.

4 DISCUSSION

The control of insect pests is still mainly based on the use of insecticides such as neonicotinoids. However, new strategies need to be developed to reduce the doses of insecticide used on crops and to limit their impact on non-target organisms. Among them, RNAi has emerged as a promising species-specific and eco-friendly alternative to manage insect pests.⁹ Unlike most of the traditional strategies for insect pest control, RNAi offers powerful control over the specificity of the control agents. In this study, we evaluated the use of dsRNAs targeting a nAChR subunit that shows low sequence homology with other subunits, the $\beta 2$ divergent subunit, to control *A. pisum* at different developmental stages. We have demonstrated through qPCR experiments that dsRNA- $\beta 2$ treatment decreased expression of the $\beta 2$ subunit at 2 h in larvae and adults, and that this decrease was maintained up to 72 h in adults. We then evaluated the use of dsRNA- $\beta 2$ alone or coupled with imidacloprid to effectively control *A. pisum* populations.

First, we demonstrated that dsRNA- $\beta 2$ alone shows insecticidal activity. At 72 h, dsRNA- $\beta 2$ treatment killed around 20% of larvae and 40% of adults suggesting the importance of the divergent $\beta 2$ nAChR subunit in *A. pisum* survival. Also, we showed that dsRNA- $\beta 2$ -treated adults exhibited modifications in the expression of several other nAChR subunits as early as 2 h. This rapid onset of what could be considered a compensatory mechanism also suggests the importance of the $\beta 2$ subunit in the physiology of *A. pisum* adults. However, no such modification has been observed in dsRNA- $\beta 2$ -treated larvae. A previous study showed that the $\beta 2$ subunit is differently expressed according to developmental stages of the pea aphid.²⁷ In particular, 1-day-old larvae have the highest expression level of $\beta 2$ subunit, whereas adults show the lowest. Thus, this compensation mechanism could only take place in dsRNA- $\beta 2$ -treated adults because the level of expression of the $\beta 2$ subunit has reached a low threshold, whereas the dsRNA- $\beta 2$ -treated larvae still have a high enough expression level of this subunit to avoid triggering such a mechanism. Moreover, such a compensation mechanism has also been reported in the Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* treated with dsRNAs targeting the $\text{Ld}\alpha 1$ subunit²⁸ and in the fruit fly *Drosophila melanogaster* treated with dsRNAs targeting either $\text{D}\alpha 1$, $\text{D}\alpha 2$ or $\text{D}\alpha 3$.²⁹ However, in these cases, no induced mortality has been reported after RNAi treatment.

Second, because the doses of insecticide used on crops must be reduced, we assessed whether the use of dsRNA- $\beta 2$ coupled to imidacloprid could be considered to effectively control an *A. pisum* population to limit the negative effects of this insecticide. Here, combined use of dsRNA- $\beta 2$ and imidacloprid at LC_{25} and LC_{50} killed around 40% of larvae and 80% of adults respectively. According to the MDR formula,²⁶ the relationship between dsRNA- $\beta 2$ and imidacloprid under these conditions is additive. Thus, dsRNA- $\beta 2$ treatment does not appear to alter the efficacy of imidacloprid. Interestingly, it is well-known that the sensitivity of nAChRs to insecticides is affected by their subunit composition.³⁰ To the best of our knowledge, dsRNAs targeting an nAChR subunit have only been associated with a decreased sensitivity to neonicotinoids through a mortality test. For instance, American cockroaches *Periplaneta americana* treated with dsRNAs targeting the $\alpha 2$ subunit,¹⁹ Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* with dsRNAs that target $\text{Ld}\alpha 1$ subunit²⁸ or brown leafhopper

Table 3. Mortality rates expressed as a corrected value according to the Abbott formula in the *Apis mellifera* oral acute toxicity test at 24 and 48 h.

Modality	Double-stranded RNA- $\beta 2$ (ng/bee)	Imidacloprid ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	24 h		48 h	
			Corrected mortality (%)	P-value (χ^2 test)	Corrected mortality (%)	P-value (χ^2 test)
Control	—	—	—	—	—	—
1	400	—	2	ns ($P = 0.617$; versus control)	4	ns ($P = 0.430$; versus control)
2	400	1×10^{-5}	9	ns ($P = 0.127$; versus control)	7	ns ($P = 0.263$; versus control)
3	400	1×10^{-4}	3	ns ($P = 0.597$; versus control)	1	ns ($P = 0.905$; versus control)
4	400	1×10^{-3}	9	ns ($P = 0.285$; versus control)	7	ns ($P = 0.263$; versus control)
5	400	1×10^{-2}	3	ns ($P = 0.597$; versus control)	4	ns ($P = 0.512$; versus control)
6	400	2×10^{-1}	12	ns ($P = 0.053$; versus control)	13	ns ($P = 0.056$; versus control)
				ns ($P = 0.123$; versus 7)		* ($P = 0.047$; versus 7)
7	—	2×10^{-1}	29	*** ($P < 0.001$; versus control)	37	*** ($P < 0.001$; versus control)

Abbreviation: ns, not significant.

Table 4. Mortality rates expressed as a corrected value according to the Abbott formula in the *Apis mellifera* contact acute toxicity test at 24 and 48 h.

Modality	Double-stranded RNA- β 2 (ng/bee)	Imidacloprid (μ g/mL)	24 h		48 h	
			Corrected mortality (%)	P-value (χ^2 test)	Corrected mortality	P-value (χ^2 test)
Control	—	—	—	—	—	—
1	400	—	—2	ns ($P = 0.315$; versus control)	4	ns ($P = 0.400$; versus control)
2	400	1×10^{-3}	—2	ns ($P = 0.436$; versus control)	3	ns ($P = 0.596$; versus control)
3	400	1×10^{-2}	1	ns ($P = 0.711$; versus control)	10	ns ($P = 0.125$; versus control)
4	400	1×10^{-1}	—2	ns ($P = 0.436$; versus control)	6	ns ($P = 0.283$; versus control)
5	400	20	22	** ($P = 0.002$; versus control)	51	*** ($P < 0.001$; versus control)
6	—	20	15	ns ($P = 0.519$; versus 6)	27	ns ($P = 0.068$; versus 6)
				* ($P = 0.016$; versus control)		*** ($P = 0.001$; versus control)

Abbreviation: ns, not significant.

Nilaparvata lugens with dsRNAs targeting the N1 α 8 subunit³¹ showed a significant decrease in mortality after exposure to imidacloprid. Although the use of dsRNAs targeting the D α 2 subunit in the fruit fly *Drosophila melanogaster* has been shown to impair the climbing ability of fruit flies,²⁹ it has not been shown that these dsRNAs combined with an exposure to imidacloprid decreased the fruit fly survival rate. All these studies focus solely on nAChR subunits that are highly conserved among insect species. However, the functional roles and the pharmacological profile of nAChRs that are composed of divergent subunits, as well as their implication in insect neonicotinoid sensitivity, remain to be elucidated. It has been shown that β 3, a divergent nAChR subunit of the cricket *Locusta migratoria*, is part of a high-affinity binding site for imidacloprid.³² Thus, divergent nAChR subunits may be involved in species-specific receptor subtypes targeted by neonicotinoids. In this work, we did not observe any obvious modulation of imidacloprid efficacy after dsRNA- β 2 treatment on larvae, suggesting that either the β 2 subunit is not involved in the formation of imidacloprid-sensitive nAChRs or that it is not the main subunit conferring sensitivity to imidacloprid at this developmental stage. However, in adults, we assume the emergence of a compensation mechanism after dsRNA- β 2 treatment. Thus, it is still hazardous to establish a link between decreased expression of the β 2 subunit and the sensitivity of *A. pisum* adult to imidacloprid. Nevertheless, because dsRNA- β 2 treatment does not appear to alter the sensitivity of *A. pisum* to imidacloprid, we suggest that they could be used in combination to effectively control these insect pests.

Finally, our aim was to demonstrate the use of dsRNA- β 2 to control *A. pisum* populations. Various studies have investigated strategies to increase the efficacy of dsRNAs in insects such as their encapsulation in nanoparticles.¹³ Here, we chose to encapsulate the dsRNA- β 2 in a cationic liposome to prevent possible degradation by aphid's nucleases. Interestingly, other strategies for enhancing RNAi efficacy without increasing the applied dose have been discussed.^{33,34} These include optimizing the length of the dsRNA of interest³⁵ on non-consensus sequence part or adding repeats of the same dsRNA sequence.³⁶ These modifications of the dsRNA sequence could be coupled to their encapsulation. Therefore, even though in this study, we have demonstrated that dsRNA- β 2 has an insecticidal effect on *A. pisum*, it will be

interesting to explore the various existing methods to increase their efficacy without increasing the dose used.

5 CONCLUSION

In this work, we have shown for the first time that RNAi targeting a divergent nAChR subunit can be used to effectively control a population of insect pests. In addition, the possible negative effects of new pest control strategies on non-target insects such as the honeybee *Apis mellifera* must be investigated before any potential use. To this end, we have demonstrated that the use of dsRNA- β 2 alone or coupled with imidacloprid did not induce acute toxicity in honeybee. This combination of control agents could therefore be considered for effective control of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* at larval and adult stages. Thus, using dsRNA alone, such as dsRNA- β 2, or combined with insecticides could allow us to lower the doses of insecticides used on crops and consequently reduce the reliance on such compounds. Finally, because it has been assumed that each insect species possesses at least one divergent nAChR subunit,¹⁷ targeting these subunits using RNAi technique could be envisaged for other insect pest species as well.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Veronique Jean for the aphid rearing and fava bean plant seeding, as well as Matthieu Petitjean, Marine Guillaume and Thomas Cuinet for their help in this work during their internship at the SiFCIR laboratory. This work was supported by SATT Ouest Valorisation and French Ministry of Research.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

SUPPORTING INFORMATION

Supporting information may be found in the online version of this article.

REFERENCES

- United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division, World Population Prospect 2022: Summary of Results, UN DESA/POP/2022/TR/NO.3 (2022).
- Casida JE and Durkin KA, Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu Rev Entomol* **58**:99–117 (2013).
- Elbert A, Haas M, Springer B, Thielert W and Nauen R, Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Manag Sci* **64**:1099–1105 (2008).
- Nauen R, Jeschke P and Copping L, In focus: neonicotinoid insecticides editorial. *Pest Manag Sci* **64**:1081 (2008).
- Jeschke P, Nauen R and Beck ME, Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a milestone for modern crop protection. *Angew Chem Int Ed* **52**:9464–9485 (2013).
- Grünwald B and Siefert P, Acetylcholine and its receptors in honeybees: involvement in development and impairments by neonicotinoids. *Insects* **10**:420, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (2019).
- Cabirol A and Haase A, The neurophysiological bases of the impact of neonicotinoid pesticides on the behaviour of honeybees. *Insects* **10**:344, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (2019).
- Steinhauer N, Kulhanek K, Antúnez K, Human H, Chantawannakul P, Chauzat M-P *et al.*, Drivers of colony losses. *Curr Opin Insect Sci* **26**:142–148 (2018).
- Christiaens O, Whyard S, Vélez AM and Smagghe G, Double-stranded RNA technology to control insect pests: current status and challenges. *Front Plant Sci* **11**:451 (2020).
- Schuster S, Miesen P and van Rij RP, Antiviral RNAi in insects and mammals: parallels and differences. *Viruses* **11**:448, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (2019).
- Zhu KY and Palli SR, Mechanisms, applications, and challenges of insect RNA interference. *Annu Rev Entomol* **65**:293–311 (2020).
- Qiao J-W, Fan Y-L, Wu B-J, Bai T-T, Wang Y-H, Zhang Z-F *et al.*, Downregulation of NADPH-cytochrome P450 reductase via RNA interference increases the susceptibility of *Acyrtosiphon pisum* to desiccation and insecticides. *Insect Sci* **29**:1105–1119 (2022).
- Yan S, Ren B-Y and Shen J, Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system: a promising approach for sustainable pest management. *Insect Sci* **28**:21–34 (2021).
- Qu X, Wang S, Lin G, Li M, Shen J and Wang D, The synergistic effect of thiamethoxam and Synapsin dsRNA targets neurotransmission to induce mortality in *Aphis gossypii*. *Int J Mol Sci* **23**:9388 (2022).
- Casida JE, Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: Progress and prospects. *Annu Rev Entomol* **63**:125–144 (2018).
- Zoli M, Pucci S, Vilella A and Gotti C, Neuronal and Extraneuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol* **16**:338–349 (2018).
- Jones AK and Sattelle DB, Diversity of insect nicotinic acetylcholine receptor subunits, in *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*, ed. by Thany SH. Springer, New York, NY, pp. 25–43 (2010).
- Dale RP, Jones AK, Tamborindéguy C, Davies TGE, Amey JS, Williamson S *et al.*, Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome. *Insect Mol Biol* **19**:141–153 (2010).
- Bantz A, Goven D, Siegwart M, Maugin S and Raymond V, Exposure to a sublethal dose of imidacloprid induces cellular and physiological changes in *Periplaneta americana*: involvement of $\alpha 2$ nicotinic acetylcholine subunit in imidacloprid sensitivity. *Pestic Biochem Physiol* **181**:105014 (2022).
- Sadeghi A, Van Damme EJM and Smagghe G, Evaluation of the susceptibility of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, to a selection of novel biorational insecticides using an artificial diet. *J Insect Sci* **9**:65–68 (2009).
- Febvay G, Delobel B and Rahbé Y, Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Can J Zool* **66**:2449–2453, NRC Research Press (1988).
- Niu J, Yang W-J, Tian Y, Fan J-Y, Ye C, Shang F *et al.*, Topical dsRNA delivery induces gene silencing and mortality in the pea aphid. *Pest Manag Sci* **75**:2873–2881 (2019).
- Pfaffl MW, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res* **29**:e45 (2001).
- Livak KJ and Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* **25**:402–408 (2001).
- Abbott WS, A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* **18**:265–267, Oxford Academic (1925).
- Belden JB, Gilliom RJ and Lydy MJ, How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integr Environ Assess Manag* **3**:364–372 (2007).
- Taillebois E, Beloula A, Quinchard S, Jaubert-Possamai S, Daguin A, Servent D *et al.*, Neonicotinoid binding, toxicity and expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the aphid *Acyrtosiphon pisum*, ed. by Smagghe G. *PLoS ONE* **9**:e96669 (2014).
- Qu Y, Chen J, Li C, Wang Q, Guo W, Han Z *et al.*, The subunit gene *Lda1* of nicotinic acetylcholine receptors plays important roles in the toxicity of imidacloprid and thiamethoxam against *Leptinotarsa decemlineata*. *Pestic Biochem Physiol* **127**:51–58 (2016).
- Komori Y, Takayama K, Okamoto N, Kamiya M, Koizumi W, Ihara M *et al.*, Functional impact of subunit composition and compensation on *Drosophila melanogaster* nicotinic receptors—targets of neonicotinoids. *PLOS Genet* **19**:e1010522, Public Library of Science (2023).
- Raymond V, Goven D, Benzidane Y, List O and Lapied B, Influence of cellular and molecular factors on membrane target sensitivity to insecticides. *Curr Med Chem* **24**:2974–2987 (2017).
- Zhang Y, Wang X, Yang B, Hu Y, Huang L, Bass C *et al.*, Reduction in mRNA and protein expression of a nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 8$ subunit is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J Neurochem* **135**:686–694 (2015).
- Bao H, Liu Y, Zhang Y and Liu Z, Two distinctive β subunits are separately involved in two binding sites of imidacloprid with different affinities in *Locusta migratoria manilensis*. *Pestic Biochem Physiol* **140**:36–41 (2017).
- Silver K, Cooper AM and Zhu KY, Strategies for enhancing the efficiency of RNA interference in insects. *Pest Manag Sci* **77**:2645–2658 (2021).
- Flynt AS, Insecticidal RNA interference, thinking beyond long dsRNA. *Pest Manag Sci* **77**:2179–2187 (2021).
- Bolognesi R, Ramaseshadri P, Anderson J, Bachman P, Clinton W, Flannagan R *et al.*, Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS ONE* **7**:e47534, Public Library of Science (2012).
- Sharath Chandra G, Asokan R, Manamohan M and Krishna Kumar N, Enhancing RNAi by using concatemeric double-stranded RNA. *Pest Manag Sci* **75**:506–514 (2019).

Figure S1. Schematic representation of the $\beta 2$ nAChR subunit gene organization. The four transmembrane regions (TM1-TM4) and the Cys-loop are represented as orange and blue boxes respectively. The specific sequence of the $\beta 2$ subunit gene that corresponds to the dsRNA- $\beta 2$ sequence is represented as a green box. Nucleic sequence alignment of this region between all the nAChR subunits of *A. pisum* is indicated at the top. At the bottom, a second nucleic sequence alignment corresponding to the Cys loop region, which characterize cysLGIC, is also represented.

Figure S2. Effect of dsRNA treatment (dsRNA-control or dsRNA- $\beta 2$) on other nAChR subunit mRNA expression level of larvae *Acyrtosiphon pisum*. qPCR experiments were performed at (A) 2 h, (B) 24 h and (C) 72 h after dsRNA-treatment. Data were normalized to the expression of the housekeeping gene RPL7 with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The reference line corresponds to the dsRNA-control condition. Data are shown as the mean \pm SEM (dsRNA-control vs dsRNA- $\beta 2$, nonparametric Mann-Whitney test; n=5 to 6).

Figure S1

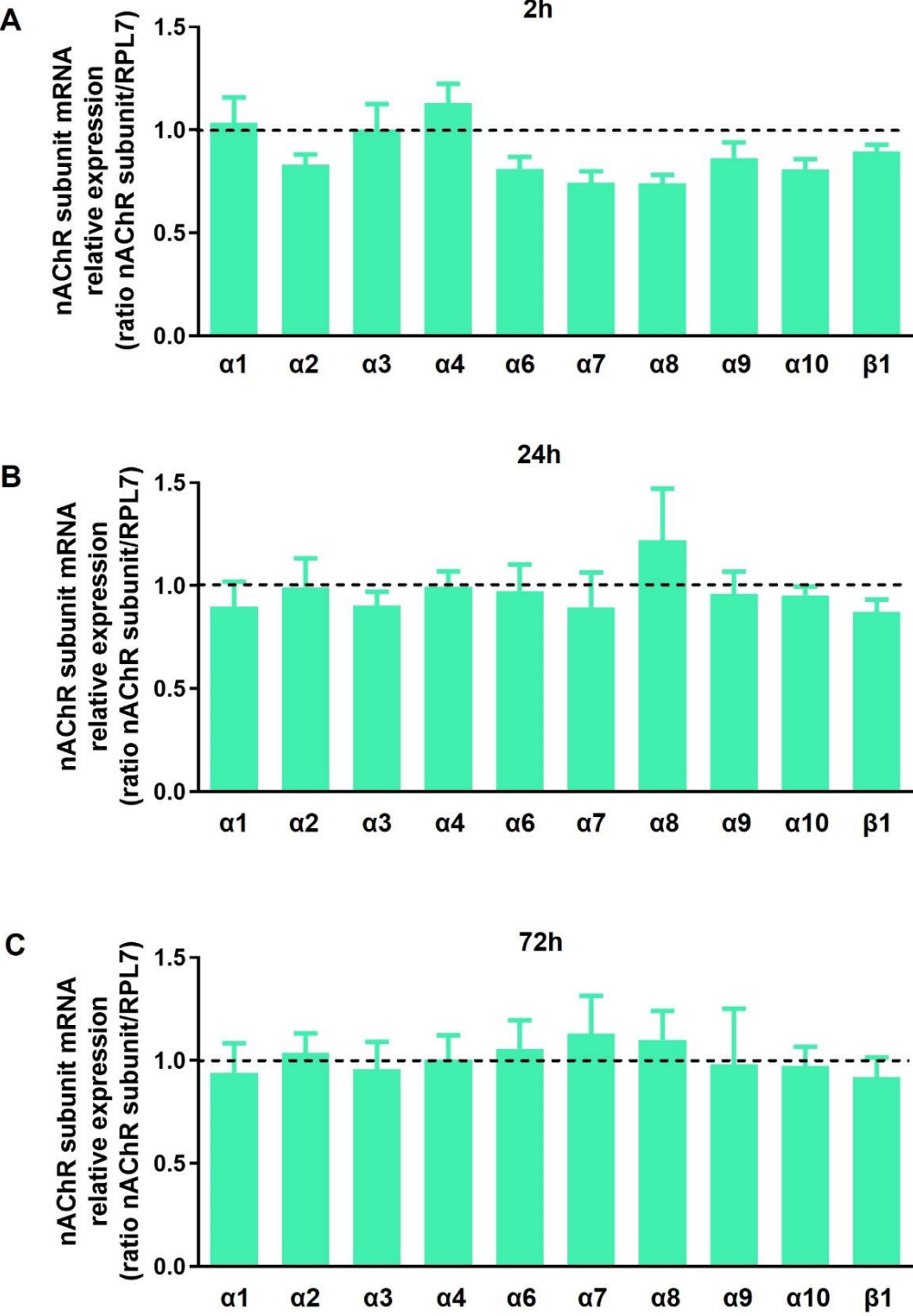
```

α6 ----TGCTGTCTCTGGCGCCGTGAAGATARAAGAAAGCGTTCAAGGTAATTCGAGAGGCAACTCTTGGATGACCTCCTAATAGATTACAAACCTCTGGAGAGACCTGTATCCAACGAAT 151
α7 ----CGTATCTGCTCATCGTCTACCTGATCAITTCGAGAAAACGCTATGCGGACCTCACGAGAAAGCGATTGCTCAACGATTTATTAGACCTTACAATACACTAGAGAGGCCAGTAAATGAAT 133
β1 TTC-----TTCGTCTGTTACAGTTCATCCGAGTTGTTGGTGTTCAGAAAGACGAGGAGCGCTGGTTAGAGACTCTTTTCAGGGCTACAATAAACTAATCAGGCCAGTCCAGAACATGA 148
α3 CGCCATAACTACTATGCATCATGCTCGTCATAATTCGGATGTTCAATGAATCCGGACGCGAAAGGCTTTACGACGACCTTTTACAATTAACAACAACCTCGTAAGGCCGTGCTCAACAACA 142
α4 ATTT---GCATTTCTGGACTCATGATTTATCCGGTAAATGGTATCTGCGAATCCGGATGCAAAAGAGACTGTACGACGATCTCTTGTCCAGTTACAACAGCTCGTAGGCCAGTGGTGAACACA 133
α2 GACGTGCTCCCTGCCGCTGCTGCTCTGTTCCGGCTCGGGTGCCTGTGCAACCCGGACGCAAGCGCTTATACGACGATCTGCTCAGCAACTACAACCGGCTCATCCGGCCCGTCCAGCAACA 250
α1 GTCATTGTC---GGTCAGTTGGCCATGCCGTACCGCTGTGTTATGGAAAGTCCGGATGCCAAACGACTTATGACGATCTGCTGAGCAACTACAACAGACTCATCAGACCCGTCGGCAACAAT 151
α8 CTCAGCTAT---TGTGAATTCGGCTTAAACAATACAAAAGTCGAAGGAACCCCTTACAAAAACATCTTTTCGATGACCTTCTGAGCAACTACAATCCGGCTGATCAGACCCGTCGCAACAAT 157
β2 ATA---GATGCTGCAAT-AACAGACAATTAAGGAAACAACATTCGAACGACGCTGGACGGATGAGTGAAGAGAGATTATTGAGTTCTACGATAGACACTGAGACCCGTTATCAGTG--- 178
α9 GGC---GACGCAAGTAA-TTCAAAAC-----TACCAGACGAAAACATCAAGGCTGGACATGAGCTGAGAAAAACAAGTGTGAAGAATTACGATAAAGTAGTGGTGCCCGC-----TACAAG 167
α10 CTG---TGGGC--TTC-TTGAGAACAG-TCCAGATATATAATCAAAATCAACAGTAGAACATATCTTGAGAAAAAATATTTTAAGAACTATGACAGATAGTGAACCTTACGCCCCCGAG 178
  
```



α6	ACG	<u>TGT</u>	AAGATCGACATCACATGGTTC	CCATTGATGACCAAAAT	<u>TGC</u>	CTT	504
α7	ACG	<u>TGC</u>	AAGATCGATATCACGTGGTTC	CCCTTCGACGATCAAAA	<u>TGT</u>	GAT	486
β1	TCC	<u>TGC</u>	ACCATAGACGTTACATATTT	CCTTTGATCAGCAAACT	<u>TGC</u>	ATA	501
α3	TCC	<u>TGT</u>	GAAATAGATGTAGAATTTT	CCCGTTGACGAAACAGAG	<u>TGT</u>	GTG	495
α4	TCG	<u>TGC</u>	GAGATCGACGTGGAATTTT	CCCGTTCGACGAGCAGAC	<u>TGC</u>	GTG	486
α2	TCG	<u>TGC</u>	GAAATCGACGTTTCGCTAT	TTCCCGTTCGATCAGCAAA	<u>TGT</u>	TTT	603
α1	TTC	<u>TGC</u>	GAGATAAACGTAGAGTACT	TCCCGTTCGACGAGCAGAC	<u>TGT</u>	TCC	504
α8	TAC	<u>TGC</u>	GAGATAAACGTTCTGTACT	TTCCGTTGACGAAACAGAA	<u>TGT</u>	TAT	510
β2	TTT	<u>TGC</u>	GATGTAGACTTGACCAATT	GGCCATTTGGAGACACACC	<u>TGT</u>	TCG	531
α9	TAC	<u>TGC</u>	CAAGCCGACATGACCTAT	TGGCCGTATGACACGCAAC	CCGGACTG	519	
α10	CAT	<u>TGC</u>	AAGACGGACACAACAAC	ACTGGCCTCACGACACGC	AGACCCGAGTC	534	

Figure S2



Résultats complémentaires

En complément des expériences d'intoxication aiguë réalisée chez l'abeille *Apis mellifera* entrepris dans cette étude, les éventuels effets délétères des dsRNA-*Apisumβ2* sur l'abeille ont également été évalués. Les tableaux 26 et 27 représentent respectivement les pourcentages d'effets délétères observés après l'ingestion ou l'application topique des dsRNA-*Apisumβ2* seuls ou combinés à l'IMI à des doses induisant de la mortalité chez le puceron du pois. Les effets délétères observés et rapportés sont les suivants : mortalité, abeilles moribondes, locomotion défaillante, contraction anormale de l'abdomen, apathie et vomissement. Que ce soit en ingestion (tableau 26, modalité 1) ou en application topique (tableau 27, modalité 1), le pourcentage d'abeilles traitées uniquement avec les dsRNA-*Apisumβ2* qui présentent des effets délétères n'est pas significativement différent du contrôle. De la même manière, hormis pour la dose la plus forte d'IMI qui a pour objectif de s'assurer de la sensibilité des abeilles à cet insecticide, la proportion d'effets délétères observés chez les abeilles traitées avec les dsRNA-*Apisumβ2* et l'IMI n'est pas significativement différente de celle obtenue dans les conditions contrôles (tableau 26, modalités 2 à 5 ; tableau 27, modalités 2 à 4). Ainsi, ces résultats suggèrent que, dans ces conditions, les dsRNA-*Apisumβ2* seuls ou combinés à l'IMI ne semblent pas induire d'effets délétères chez l'abeille *Apis mellifera*.

Modalité	dsRNA- Apisumβ2 (ng/abeille)	[IMI] (µg/mL)	24h		48h	
			Effet (%)	p-value (test de Chi ²)	Effet (%)	p-value (test de Chi ²)
Contrôle	-	-	5	-	5	-
1	400	-	6	ns (p=0,617 ; vs Contrôle)	9	ns (p=0,430 ; vs Contrôle)
2	400	1.10 ⁻⁵	12	ns (p=0,127 ; vs Contrôle)	15	ns (p=0,263 ; vs Contrôle)
3	400	1.10 ⁻⁴	6	ns (p=0,597 ; vs Contrôle)	21	ns (p=0,905 ; vs Contrôle)
4	400	1.10 ⁻³	15	ns (p=0,285 ; vs Contrôle)	15	ns (p=0,263 ; vs Contrôle)
5	400	1.10 ⁻²	9	ns (p=0,597 ; vs Contrôle)	12	ns (p=0,512 ; vs Contrôle)
6	400	2.10 ⁻¹	15	ns (p=0,053 ; vs Control) ns (p=0,123 ; vs 8) ***	24	ns (p=0,056 ; vs Contrôle) * (p=0,047 ; vs 7) ***
7	-	2.10 ⁻¹	34	(p<0,001 ; vs Contrôle)	41	(p<0,001 ; vs Contrôle)

Tableau 26 : Tableau représentant le pourcentage d'effets délétères cumulés sur des abeilles *Apis mellifera* (mortalité, abeille moribonde, locomotion défaillante, contraction anormale de l'abdomen, apathie et vomissement) après l'ingestion de dsRNA-*Apisumβ2* seuls ou combinés à l'imidaclopride (IMI) à des doses induisant de la mortalité chez le puceron *Acyrtosiphon pisum*.

Modalité	dsRNA- Apisumβ2 (ng/abeille)	[IMI] (µg/mL)	24h		48h	
			Effet (%)	p-value (test de Chi ²)	Effet (%)	p-value (test de Chi ²)
Contrôle	-	-	2	-	4	-
1	400	-	2	ns (p=1 ; vs Contrôle)	8	ns (p=0,400 ; vs Contrôle)
2	400	1.10 ⁻³	3	ns (p=0,711 ; vs Contrôle)	10	ns (p=0,283 ; vs Contrôle)
3	400	1.10 ⁻²	7	ns (p=0,287 ; vs Contrôle)	13	ns (p=0,125 ; vs Contrôle)
4	400	1.10 ⁻¹	3	ns (p=0,711 ; vs Contrôle)	13	ns (p=0,125 ; vs Contrôle)
5	400	20	10	ns (p=0,112 ; vs Contrôle)	27	** (p=0,003 ; vs Contrôle)
6	-	20	43	*** (p<0,001 ; vs Contrôle)	73	*** (p<0,001 ; vs Contrôle)

Tableau 27 : Tableau représentant le pourcentage d'effets délétères cumulés sur des abeilles *Apis mellifera* (mortalité, abeille moribonde, locomotion défaillante, contraction anormale de l'abdomen, apathie et vomissement) après l'application topique de dsRNA-Apisumβ2 seuls ou combinés à l'imidaclopride (IMI) à des doses induisant de la mortalité chez le puceron *Acyrtosiphon pisum*.

Etude 2 : Evaluation de l'utilisation des dsRNAs qui ciblent l'acétylcholinestérase de type 1 du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* pour mimer les effets des insecticides inhibant cette enzyme ou en complément de ces derniers (étude préliminaire)

1. Contexte et objectifs de l'étude

Comme décrit précédemment, les insecticides néonicotinoïdes ont longtemps été utilisés pour lutter contre les diverses espèces de puceron. Cependant, leur utilisation est aujourd'hui interdite en France mais des dérogations quant à leur utilisation ont vu le jour ces dernières années. En remplacement, des composés issus d'autres familles d'insecticides sont actuellement utilisés en champs tels que des carbamates comme le pirimicarbe (<https://ephy.anses.fr/substance/pirimicarb>; consultée le 24/07/2023). Ce dernier agit comme un inhibiteur de l'activité enzymatique de l'AChE d'insecte (Casida et Durkin, 2013a). Cependant, l'utilisation massive et non-raisonnée de ces insecticides a conduit à l'apparition de phénomènes de résistance par une pression de sélection et des effets délétères de ces composés sur des organismes non-cibles. Ainsi, il est nécessaire de diminuer les doses de carbamates répandues en champs. Des études précédentes ont rapporté que l'utilisation de dsRNAs ciblant l'AChE permettait de lutter efficacement contre des espèces d'insectes (Mou *et al.*, 2017; Sharath Chandra *et al.*, 2019). Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, la majorité des insectes présentent deux types d'AChE, l'AChE1 et l'AChE2. En particulier, pour la majorité des insectes qui appartiennent à l'ordre des hémiptères, comme les diverses espèces de pucerons, l'AChE1 est principalement responsable de l'hydrolyse de l'ACh (Kim et Lee, 2013). Chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*, des séquences nucléotidiques qui codent pour l'AChE1 et l'AChE2 ont pu être prédites (Mou *et al.*, 2017). Ainsi, sachant que les insecticides utilisés aujourd'hui pour lutter contre le puceron agissent comme des inhibiteurs de l'activité enzymatique de l'AChE, le premier objectif de cette étude préliminaire est d'évaluer l'utilisation d'un dsRNA ciblant l'AChE1 du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* (dsRNA-ApisumAChE1) comme agent de biocontrôle permettant ainsi de mimer les effets des insecticides ciblant l'AChE. Le second objectif est de déterminer si les dsRNA-ApisumAChE1 peuvent être combinés à l'utilisation du pirimicarbe pour en réduire les doses utilisées. Pour ce faire, les effets des dsRNA-ApisumAChE1 ont été évalués par des expériences de qPCR et de dosage de l'activité enzymatique. Puis, des expériences toxicologiques préliminaires ont été réalisées pour déterminer l'impact du traitement avec les dsRNA-ApisumAChE1 sur la survie du puceron. Enfin, la toxicité aiguë du pirimicarbe sur le puceron a été évaluée afin d'amorcer les expériences visant à étudier l'utilisation combinée des dsRNA-ApisumAChE1 et du pirimicarbe.

2. Effet des dsRNA-ApisumAChE1 sur l'expression des transcrits de l'AChE1

Dans un premier temps, l'effet des dsRNA-ApisumAChE1 a été évalué sur l'expression des transcrits de l'AChE1 du puceron adulte. Pour ce faire, des expériences de qPCR ont été réalisées à 2h, 24h et 48h après

l'application topique des lipoplexes contenant 400ng de dsRNAs (dsRNA-LacZ ou dsRNA-ApisumAChE1). A 2h, l'expression des transcrits de l'AChE1 est significativement diminuée d'environ 40% chez les pucerons traités avec les dsRNA-ApisumAChE1 comparée à celle des pucerons contrôles ayant reçu les dsRNA-LacZ (figure 38). En revanche, à partir de 24h, cette diminution n'est plus observée. Ainsi, les dsRNA-ApisumAChE1 diminuent efficacement l'expression des ARNm de l'AChE1 à 2h.

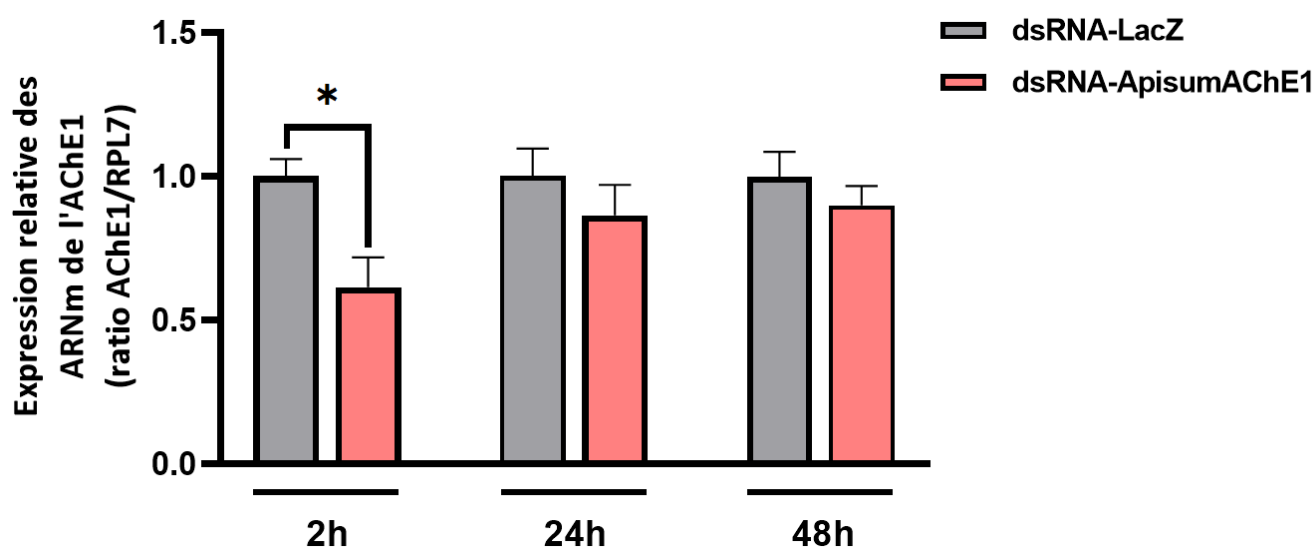


Figure 38 : Quantification par qPCR de l'expression des transcrits de l'AChE1 des pucerons *Acyrtosiphon pisum* traités avec les dsRNAs d'intérêt (dsRNA-LacZ ou dsRNA-ApisumAChE1) à 2h, 24h et 48h. L'expression relative est normalisée avec le gène RPL7 (gène de référence) selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (* $p < 0,05$; dsRNA-ApisumAChE1 vs dsRNA-LacZ ; test non-paramétrique de Mann-Whitney ; $n = 4$ à 8).

3. Effet des dsRNA-ApisumAChE1 sur l'activité enzymatique de l'AChE du puceron

Afin d'évaluer les effets des dsRNA-ApisumAChE1 sur l'activité enzymatique de l'AChE du puceron adulte, des expériences de dosage enzymatique ont été réalisées. Pour ce faire, des mesures de l'activité enzymatique de l'AChE ont été effectuées selon la méthode d'Ellman 2h, 24h, 48h et 72h après l'application topique de lipoplexes contenant les dsRNAs d'intérêt (dsRNA-LacZ ou dsRNA-ApisumAChE1). A 48h, une diminution significative d'environ 15% de l'activité enzymatique de l'AChE a été observée (figure 39). Ainsi, la diminution d'expression des transcrits de l'AChE1 observée à 2h pourrait impacter l'activité enzymatique globale de l'AChE du puceron à 48h.

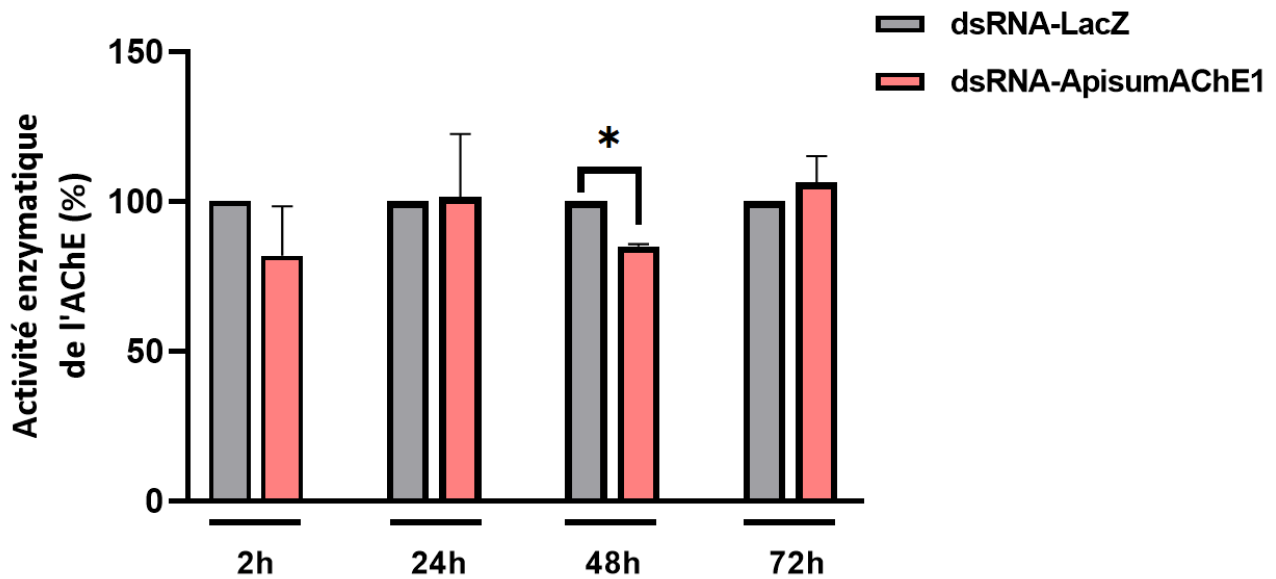


Figure 39 : Effet des dsRNA-ApisumAChE1 sur l'activité enzymatique de l'AChE. Les mesures d'activité enzymatique ont été réalisées selon la méthode d'Ellman 2h, 24h, 48h et 72h après le traitement des pucerons adultes *Acyrtosiphon pisum* avec les dsRNAs d'intérêt (dsRNA-LacZ ou dsRNA-ApisumAChE1). Les densités optiques mesurées ont été rapportées à la quantité de protéines totales dans les échantillons et les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité en fonction de la condition contrôle (* $p < 0,05$; dsRNA-ApisumAChE1 vs dsRNA-LacZ ; test non-paramétrique de Mann-Whitney ; $n=4$).

4. Evaluation de l'utilisation des dsRNA-ApisumAChE1 comme bioinsecticide

Afin d'évaluer le potentiel effet insecticide des dsRNA-ApisumAChE1, des expériences préliminaires d'intoxication aiguë avec ces dsRNAs ont été réalisées sur des pucerons adultes. Pour ce faire, la mortalité des pucerons est évaluée 24h, 48h et 72h après l'application topique de lipoplexes contenant 400ng de dsRNAs d'intérêt (dsRNA-LacZ ou dsRNA-ApisumAChE1). Une augmentation d'environ 15%, 40% et 55% de la mortalité est observée à 24h, 48h et 72h respectivement chez les pucerons ayant reçu les dsRNA-ApisumAChE1 par rapport aux pucerons contrôles traités avec les dsRNA-LacZ (figure 40). Ainsi, ces résultats préliminaires suggèrent que les dsRNA-ApisumAChE1 présenteraient un effet insecticide sur les pucerons et qu'ils pourraient être envisagés en tant que bioinsecticide.

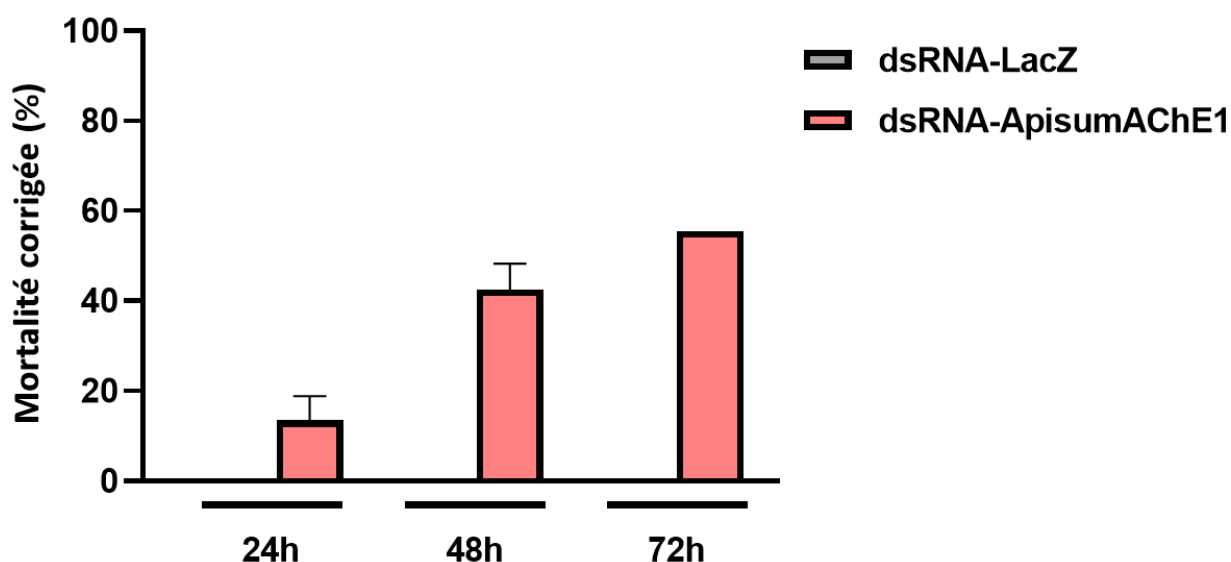


Figure 40 : Evaluation de l'utilisation des dsRNA-ApisumAChE1 comme bioinsecticide. Les histogrammes représentent le pourcentage de mortalité corrigée par rapport au contrôle (dsRNA-LacZ) obtenu selon la formule d'Abbott chez les pucerons adultes *Acyrtosiphon pisum* traités avec les dsRNAs d'intérêt (dsRNA-LacZ ou dsRNA-ApisumAChE1) (n=1 à 3 avec 40 pucerons par n).

5. Evaluation de la toxicité aiguë du pirimicarbe sur le puceron

L'un des objectifs de cette étude est d'évaluer l'utilisation combinée des dsRNA-ApisumAChE1 et du pirimicarbe pour lutter efficacement contre les populations de pucerons tout en réduisant les doses d'insecticides utilisées. Ainsi, la dernière partie de cette étude préliminaire se concentre sur l'évaluation de la toxicité du pirimicarbe sur le puceron du pois en se basant sur l'élaboration de courbes concentration-réponse obtenues à partir d'expériences d'intoxication aiguë à cet insecticide. Pour ce faire, des larves de pucerons ont été intoxiquées avec une solution de pirimicarbe à une concentration comprise entre 10^{-9} M et 10^{-4} M. La mortalité a été rapportée à 48h et 72h (figure 41). Selon ces courbes encore incomplètes, les CL_{50} à 48h et 72h seraient respectivement environ égales à $1,5 \cdot 10^{-6}$ M et 10^{-6} M.

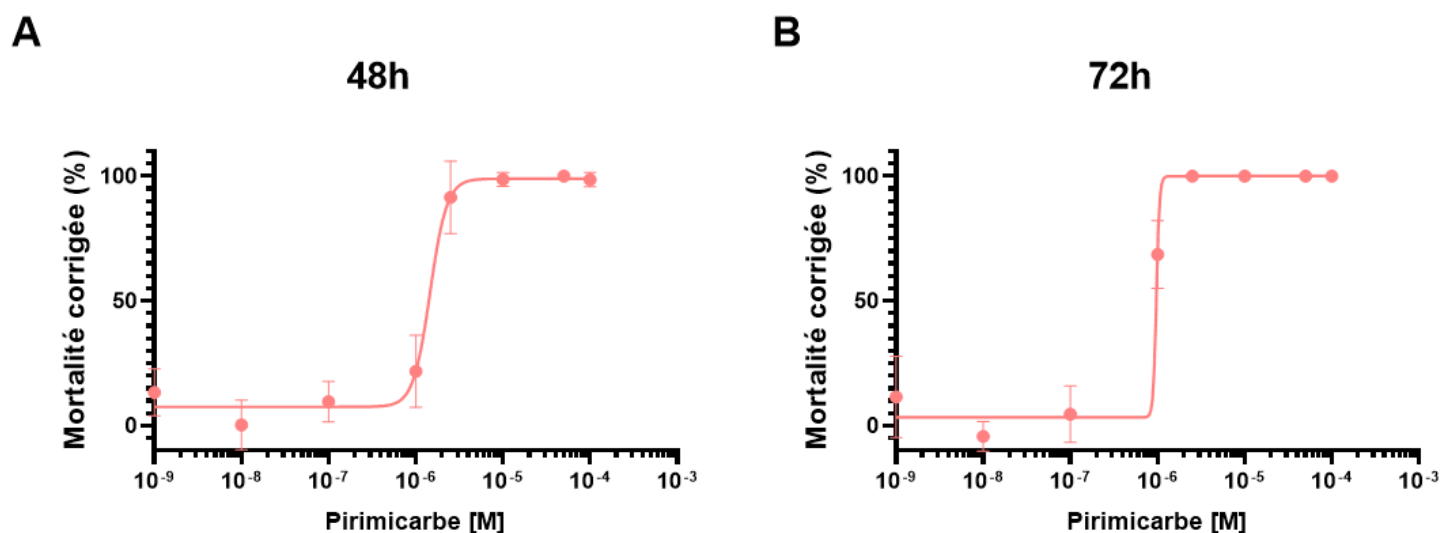


Figure 41 : Courbes de mortalité des larves de puceron *Acyrthosiphon pisum* obtenues après des expériences d'intoxication aiguë au pirimicarbe à une concentration comprise entre 10^{-9} M et 10^{-4} M. Le taux de mortalité a été rapporté à 48h (A) et 72h (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage de mortalité corrigée selon la formule d'Abbott (n=3 à 5).

6. Discussion

Dans cette étude préliminaire, nous avons démontré dans un premier temps que l'application de dsRNA-ApisumAChE1 permet de diminuer significativement l'expression des transcrits de l'AChE1. En complément, nous avons également observé une diminution significative de l'activité enzymatique globale de l'AChE à 48h chez des pucerons traités avec ces mêmes dsRNAs. Une étude réalisée chez une autre espèce de puceron, *Aphis citricidus*, a également démontré que l'utilisation de dsRNAs ciblant l'AChE1 de cet insecte permettait de diminuer l'activité enzymatique globale de l'AChE (Mou *et al.*, 2017). De plus, l'utilisation de dsRNAs dirigés contre l'AChE comme bioinsecticide a déjà été rapportée chez le puceron *Aphis citricidus* (Mou *et al.*, 2017) mais également chez la teigne *Plutella xylostella* (Sharath Chandra *et al.*, 2019). Dans notre étude, les dsRNA-ApisumAChE1 présenteraient aussi un effet insecticide sur le puceron *Acyrthosiphon pisum*. Ces résultats préliminaires suggèrent donc que comme chez de nombreuses espèces d'insectes (Kim et Lee, 2013), l'AChE1 jouerait un rôle important dans la neurotransmission cholinergique chez le puceron *Acyrthosiphon pisum*. Ainsi, ces dsRNAs pourraient être envisagés comme agent de biocontrôle. Pour compléter cette étude, les expériences d'intoxication aiguë avec les dsRNA-ApisumAChE1 seuls devront être complétées.

Chez le puceron *Acyrthosiphon pisum*, des séquences codantes pour l'AChE1 et l'AChE2 ont été prédites (Mou *et al.*, 2017). Les séquences codantes des AChE1 et AChE2 prédites par les auteurs ont une taille de 2031pb et de 1992pb respectivement. Elles présentent un pourcentage d'homologie de séquence d'environ 49%. Cependant, à ce jour, aucune donnée sur la caractérisation de ces AChEs n'est disponible chez ce puceron. C'est pourquoi, il est envisagé de séquencer les deux types d'AChE du puceron et de déterminer, notamment par qPCR, l'AChE catalytique principale chez ce ravageur. Ces données pourront être complétées par la mesure de leur activité estérasiqne en exprimant chacune de ces AChEs dans un système hétérologue tel

que les cellules Sf9 d'insecte. En effet, bien que pour la majorité des insectes de l'ordre des hémiptères l'AChE1 est l'enzyme principalement responsable de l'hydrolyse de l'ACh, pour certains d'entre eux il s'agit de l'AChE2 (Kim et Lee, 2013). En ce sens, l'AChE2 du puceron *Acyrtosiphon pisum* pourrait également être une cible de choix de l'ARNi. De plus, une étude précédente a démontré que l'utilisation de dsRNAs qui ciblent l'AChE1 ou l'AChE2 du puceron *Aphis citricidus* impacte la survie de cet insecte (Mou *et al.*, 2017). Ainsi, il pourrait être également intéressant d'évaluer l'utilisation de dsRNAs qui ciblent l'AChE2 seule ou combinée à l'utilisation des dsRNA-ApisumAChE1 pour lutter contre le puceron *Acyrtosiphon pisum*.

L'expression de ces AChEs dans un système hétérologue permettra également de déterminer la sensibilité de chacune des AChEs aux insecticides organophosphorés ou carbamates. De nombreuses espèces d'insectes ont développé des résistances à ces insecticides. Ces résistances peuvent être liées à des mutations ponctuelles telles que la mutation G119S (Zhang *et al.*, 2017; Elanga-Ndille *et al.*, 2019) et à la duplication du gène *ace* généralement induite par l'exposition à l'insecticide (Lee *et al.*, 2015). Cette duplication concerne généralement le gène *ace1*. Cependant, il a été montré chez le puceron *Aphis gossypii* que la duplication du gène *ace2* était impliquée dans la perte de sensibilité de ce puceron aux organophosphorés (Shang *et al.*, 2014). Ainsi, l'utilisation de dsRNAs aurait également l'avantage par rapport aux insecticides de contourner les mécanismes de résistance mis en jeu par les insectes.

Un autre avantage de l'utilisation des dsRNAs serait de pouvoir diminuer les doses d'insecticides utilisées. Dans notre étude, on suppose que l'utilisation des dsRNA-ApisumAChE1 et du pirimicarbe qui est un des insecticides actuellement utilisés dans la lutte contre les pucerons, entraînerait des conséquences similaires sur la physiologie du puceron, c'est-à-dire de diminuer l'hydrolyse de l'ACh dans la synapse et d'engendrer la mort de l'insecte. Ainsi, l'utilisation des dsRNA-ApisumAChE1 pourrait permettre de diminuer les doses de pirimicarbe utilisées. Afin d'évaluer par la suite si la combinaison des dsRNA-ApisumAChE1 et du pirimicarbe peut être utilisée pour lutter contre le puceron *Acyrtosiphon pisum*, des tests toxicologiques ont été réalisés dans un premier temps avec un traitement uniquement avec le pirimicarbe. Grâce à ces tests, la sensibilité des pucerons au pirimicarbe a été mise en évidence. Ces résultats étant préliminaires devront être complétés. Dans un deuxième temps, des expériences toxicologiques combinant les traitements de dsRNAs et de pirimicarbe seront réalisées afin de déterminer si les dsRNAs dirigés contre l'AChE1 pourraient être utilisés en complément d'un traitement au pirimicarbe.

Nos premiers résultats indiquent que dans le système cholinergique de l'insecte, l'AChE pourrait également être une cible de choix de l'interférence ARN afin de lutter contre les pucerons du pois.

Etude 3 : Utilisation de la technique d'interférence ARN dirigée contre une sous-unité nicotinique pour contourner les mécanismes d'accommodation aux insecticides : exemple de la sous-unité nicotinique Pame β 1 chez la blatte *Periplaneta americana* accommodée à l'imidaclopride

1. Synthèse de l'article

Les phénomènes de résistance et d'accommodation aux insecticides sont un frein majeur à l'augmentation des rendements agricoles indispensable pour répondre aux besoins alimentaires croissants de la population. En ce sens, des études se sont intéressées à l'utilisation de la technique d'interférence ARN pour contourner les phénomènes de résistance aux insecticides mis en place par les insectes (Killiny *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). En revanche, aucune étude n'a rapporté l'utilisation de l'ARNi pour contourner les phénomènes d'accommodation aux insecticides qui peuvent faire intervenir des mécanismes cellulaires et moléculaires différents de la résistance. Au laboratoire SiFCIR, un modèle de blatte *Periplaneta americana* accommodée à l'IMI après une exposition à une dose sublétales de cet insecticide pendant trente jours a été développé afin de pouvoir élucider les mécanismes sous-jacents à ce phénomène d'accommodation (Benzidane *et al.*, 2017; Bantz *et al.*, 2022). En particulier, l'implication des sous-types de récepteurs nicotiniques nAChR1 et nAChR2, dans l'accommodation à l'IMI après une exposition à une dose sublétales a pu être démontré par des approches électrophysiologique et d'analyse d'expression des sous-unités nicotiniques (Benzidane *et al.*, 2017). Les nAChR1 et nAChR2 sont respectivement composés des sous-unités nicotiniques Pame α 3, Pame α 8, Pame β 1 et Pame α 1, Pame α 2, Pame β 1 (Sun *et al.*, 2017). Cette étude a donc pour objectif d'évaluer l'effet de l'ingestion de dsRNAs qui ciblent la sous-unité nicotinique Pame β 1 (dsRNA-Pame β 1 ou dsRNA- β 1 dans l'article), qui compose les nAChR1 et nAChR2, sur la sensibilité à l'IMI de blattes accommodées à cet insecticide après une exposition à une dose sublétales.

Dans un premier temps, l'effet de l'ingestion de dsRNA-Pame β 1 sur le niveau d'expression des transcrits de la sous-unité nicotinique Pame β 1 a été évalué par qPCR chez des blattes non-accommodées et accommodées à l'IMI après une exposition à une dose sublétales de cet insecticide. Ainsi, 96h après l'ingestion, l'expression des transcrits de cette sous-unité nicotinique est diminuée de 23% et 14% par rapport au contrôle chez des blattes non-accommodées et accommodées respectivement. De plus, aucune modification de l'expression des autres sous-unités nicotiniques identifiées chez la blatte n'a été observée après l'ingestion de dsRNA-Pame β 1, suggérant la spécificité des dsRNAs d'intérêt et qu'aucun phénomène de compensation n'a été mis en place par la blatte. Enfin, des expériences d'intoxication aiguë à l'IMI couplées à l'ingestion de dsRNA-Pame β 1 sur des blattes non-accommodées et accommodées à cet insecticide ont été réalisées. Ces expériences ont permis de démontrer que l'ingestion de dsRNA-Pame β 1 ne modifie pas la sensibilité à l'IMI des blattes non-accommodées mais qu'elle permet d'augmenter la sensibilité des blattes accommodées à un niveau similaire à celui des blattes non-accommodées.

Ainsi, pour la première fois, il a été démontré que l'utilisation de la technique d'ARNi permettait de contourner les phénomènes d'accommodation à un insecticide. Ainsi, cibler une sous-unité nicotinique avec cette technique pourrait être envisagé pour développer de nouvelles stratégies de gestion de l'accommodation aux insecticides agissant sur les nAChRs.

2. Article accepté pour publication

Cette étude a fait l'objet d'un article en premier auteur acceptée pour publication dans le journal à comité de lecture international *Journal of Pesticide Science*.

Using RNA interference targeting a nicotinic acetylcholine receptor subunit to counteract insecticide accommodation mechanisms: example of the $\beta 1$ subunit in the imidacloprid-accommodated American cockroach *Periplaneta americana*.

Ligonniere, S., Bantz, A., Raymond, V. & Goven, D.

1 **Using RNA interference targeting a nicotinic acetylcholine receptor subunit to counteract**
2 **insecticide accommodation mechanisms: example of the β 1 subunit in the imidacloprid-**
3 **accommodated American cockroach, *Periplaneta americana***

4 Sebastien Ligonniere¹, Alexandre Bantz¹, Valerie Raymond*, Delphine Goven

5 ¹co-first authorship: these two authors contributed equally to this work.

6 Univ Angers, INRAE, SIFCIR, SFR QUASAV, F-49000 Angers, France

7 **Running title:** RNAi to counteract insecticide accommodation

* valerie.raymond@univ-angers.fr

8 **Abstract**

9 Insecticide accommodation and resistance are limiting factors to the much-needed increase in
10 agricultural production. Various physiological and cellular modifications, such as the changes
11 of insecticide molecular targets, have been linked to these events. Thus, a previous study
12 demonstrated that the imidacloprid accommodation set up by the cockroach *Periplaneta*
13 *americana* after an exposure to a sublethal dose of this insecticide involves functional
14 alterations of two nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subtypes. As RNA interference
15 (RNAi) is one of the most promising strategies for controlling pest insects, we evaluated, in this
16 study, the use of RNAi that targets the $\beta 1$ nAChR subunit to counteract the imidacloprid
17 accommodation phenomenon in cockroaches. Interestingly, we showed that ingestion of
18 dsRNA- $\beta 1$ increased the sensitivity to imidacloprid of accommodated cockroaches. Thus, we
19 have demonstrated for the first time that RNAi that targets an nAChR subunit can counteract
20 the accommodation mechanism to insecticide targeting nAChRs set up by an insect.

21 **Keywords:** RNA interference, nicotinic acetylcholine receptor subunit, insecticide resistance,
22 pest control, imidacloprid

23 The online version of this article contains supplementary material (Supplemental Figures S1-
24 S2 and Tables S1-S2), which is available at <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jpestics/>.

25 Introduction

26 Contemporary agriculture is facing a new challenge that is to ensure a quality production able
27 to meet the growing food needs. Until now, the crop protection and the increase of their yields
28 was mainly based on the use of pesticides such as insecticides. However, several decades of
29 widespread insecticide use have led to the appearance of resistant insect populations through
30 selection pressure¹. Therefore, as agriculture evolves towards ecological crop protection,
31 developing new tools to counteract the resistance mechanisms set up by the insects and to
32 reduce the doses of insecticide used on crops is crucial to enable a safer and more sustainable
33 agricultural production. Moreover, the exposure of insecticides, even at sublethal doses, can
34 lead to accommodation in insect pests in a relatively short time². This effect could also
35 contribute to the emergence of insecticide resistance. Thus, it is necessary to take into account
36 both accommodation and resistance phenomena to develop novel pest management strategies.
37 One of the most promising strategies is the use of RNA interference technology (RNAi)³. RNAi,
38 unlike most of the traditional technologies of insect pest control, offers a powerful control over
39 the specificity of the control agents. Recently, some studies have shown that a single double-
40 stranded RNA (dsRNA) treatment of the insect can improve its sensitivity to neonicotinoid
41 insecticides such as imidacloprid or thiamethoxam^{4,5}.

42 Neonicotinoids (IRAC classification ID 4A) are one of the major classes of insecticide⁶
43 that act as nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists in the insect central nervous
44 system⁷. Among all the neonicotinoids, imidacloprid was the top-selling insecticide for many
45 years⁷. Insect resistance mechanisms to neonicotinoids were attributed to modifications of the
46 detoxification enzyme activity, target-site mutations or quantitative changes in nAChR
47 subunits⁶. Indeed, several studies have focused on assessing the involvement of nAChR
48 subunits in imidacloprid sensitivity and resistance of insects⁸⁻¹⁰. In particular, scientists
49 investigated the involvement of $\beta 1$ subunit¹¹⁻¹⁴. In the American cockroach *Periplaneta*

50 *americana*, the $\beta 1$ subunit is part of at least two α -bungarotoxin-insensitive nAChR subtypes
51 named nAChR1 and nAChR2¹⁵. These nAChR subtypes are found on dorsal unpaired median
52 neurons (DUM neurons) that are commonly used as biological model to study the mode of
53 action of insecticides and differ in their sensitivity to imidacloprid¹⁶. A previous study carried
54 out on cockroaches that were exposed to a sublethal dose of imidacloprid for 30 days
55 demonstrated that they were accommodated to this insecticide⁸. This reduced sensitivity
56 involves a downregulation of the expression of the $\alpha 2$ subunit which composes nAChR2 with
57 $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits⁸. Using patch-clamp recordings on DUM neurons, it was demonstrated that
58 this exposure diminished the sensitivity of the DUM neurons to imidacloprid and this decrease
59 could be linked to changes of these two nAChR subtypes¹⁷. Thus, nAChR subunits seem to be
60 key elements to target with RNAi for pest control. Moreover, to date, no study has been carried
61 out on the use of RNAi on accommodated insects which therefore present physiological and
62 cellular modifications that may be different from those observed in resistant insects.

63 Since a unique treatment of dsRNA targeting an nAChR subunit of the cockroach is able to
64 alter its expression but also its sensitivity to imidacloprid⁸ and the $\beta 1$ subunit is part of both
65 nAChR1 and nAChR2, the aim of this study is to evaluate the use of RNAi targeting this subunit
66 to counteract the accommodation mechanism set up by the cockroach after an exposition to a
67 sublethal dose of imidacloprid. First, we demonstrated by qPCR experiments that a single
68 ingestion of dsRNA targeting $\beta 1$ subunit (dsRNA- $\beta 1$) induced a decrease in its expression in
69 non-accommodated and imidacloprid accommodated cockroaches. In addition, acute
70 imidacloprid intoxication tests coupled with dsRNA- $\beta 1$ ingestion were performed. The
71 ingestion of dsRNA- $\beta 1$ did not modify the sensitivity of non-accommodated cockroaches but
72 restored the sensitivity to imidacloprid of accommodated cockroaches. For the first time, we
73 have shown that RNAi targeting an nAChR subunit can counteract the accommodation
74 mechanism to an insecticide acting on nAChRs.

75 Materials and methods

76 1. Insects

77 All the experiments were performed on non-accommodated and imidacloprid accommodated
78 adult male American cockroaches *P. americana* which were obtained according to the protocol
79 described previously^{8,17}. The cockroaches were reared under standard conditions in our
80 laboratory at 28 °C and with a photocycle of 12 h light/12 h dark.

81 2. dsRNA synthesis

82 To obtain dsRNA that targets the cockroach $\beta 1$ nAChR subunit (dsRNA- $\beta 1$), a specific
83 fragment (100 bp) of the coding sequence of this subunit (accession No. MW201213) was
84 amplified by PCR. This amplification was done using a high-fidelity Novagen™ KOD Hot
85 Start DNA polymerase (Merck, Darmstadt, Germany) with specific primers each containing the
86 T7 RNA polymerase promoter sequence (ds_ $\beta 1$, Supplemental Table S1). In parallel, control
87 dsRNA targeting the bacterial β -galactosidase (dsRNA-control) were produced. To do so, a
88 specific fragment of 100 bp of the bacterial β -galactosidase coding sequence was amplified
89 from the recombinant vector PCR-Blunt_ $\beta 1$ with a primer set (ds_control, Supplemental Table
90 S1). After a purification of the PCR products with the Nucleospin® Gel and PCR Clean-up kit
91 (Macherey Nagel, Düren, Germany), an *in vitro* transcription reaction was performed using the
92 MEGAscript T7 kit (Ambion, Grand Island, NY, USA). The resulting transcripts were treated
93 with DNase then purified with the NucleoSpin® miRNA kit (Macherey Nagel, Düren,
94 Germany). Finally, the resulting dsRNA were denatured at 95 °C for 5 min and re-hybridized
95 at room temperature for 90 min. The dsRNA were stocked at -20 °C until use.

96 3. dsRNA treatment

97 All experiments were performed on non-accommodated and accommodated cockroaches orally
98 treated with dsRNA. To do this, dsRNA lipoplex solutions containing 0.25 μ g of dsRNA- $\beta 1$ or
99 dsRNA-control mixed with 1 μ L of Escort IV® transfection reagent (Sigma-Aldrich, Saint

100 Quentin Fallavier, France) and 5% glucose solution up to 10 μ L were prepared according to the
101 protocol previously described⁸ and then incubated at room temperature for 30 min. Finally,
102 cockroaches were fed with 10 μ L of these solutions according to the ingestion protocol
103 described by Huang *et al.* (2018)¹⁸.

104 4. qPCR experiments

105 Quantitative PCR (qPCR) experiments were performed on CFX Connect™ Real-Time PCR
106 detection system (Biorad, Hercules, CA, USA) to evaluate the relative expression level of
107 nAChR subunits in the terminal abdominal ganglia (TAG) of non-accommodated and
108 accommodated dsRNA-treated cockroaches. To do this, 96 h after dsRNA ingestion (dsRNA-
109 β 1 or dsRNA-control), the TAG which contain DUM neurons were dissected and total RNA
110 were extracted using the Nucleospin® RNA kit (Macherey Nagel, Düren, Germany) according
111 to the manufacturer's protocol, followed by a sodium/acetate precipitation. Then, 500 ng of
112 purified RNA were reverse transcribed using RevertAid H Minus First Strand cDNA
113 Synthesis® kit (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). After a RNase H treatment (Thermo
114 Fisher Scientific, Illkirch, France) of 20 min at 37 °C followed by an inactivation step at 65 °C
115 for 10 min, the cDNA were diluted at 1/20 and stocked at -20 °C. Each reaction of qPCR was
116 done in duplicate and carried out in 20 μ L containing 5 μ L of a 20-fold dilution of cDNA, 1
117 μ M of each primer set (Supplemental Table S2) and 10 μ L of 2X Takyon No Rox SYBR®
118 Master Mix Blue dTTP (Eurogentec, Seraing, Belgium). The qPCR program consisted of a first
119 step at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles comprising a denaturation step of 15 s at 95 °C
120 and either an annealing step of 20 s at the optimal temperature followed by an elongation step
121 of 40 s at 72 °C for α 5, β 3, β 4 and β 6 nAChR subunits or a combined annealing-elongation step
122 of 1 min at the optimal temperature for actin and other nAChR subunits (Supplemental Table
123 S2). In qPCR amplification reactions, the efficiency of each specific primer set was between
124 98% and 102%. To validate specificity of each primer sets, melting curve analyses were carried

125 out after the qPCR reactions. Relative mRNA expression levels of all the nAChR subunits on
126 dsRNA-treated cockroaches were determined according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method¹⁹ for which actin
127 gene was used as the housekeeping gene in agreement with previous studies^{8,17} and the
128 expression level of each nAChR subunit obtained in the dsRNA- $\beta 1$ condition was normalized
129 with its counterpart in the control condition (dsRNA-control).

130 5. Insecticide exposure

131 Toxicological tests were all carried out on the two different groups named respectively non-
132 accommodated and accommodated cockroaches which were obtained according to the protocol
133 described previously^{8,17}. Then, 96 h after a unique ingestion of dsRNA lipoplexes, an acute
134 intoxication to imidacloprid was performed at the lethal dose 50 (LD₅₀, 2.5 $\mu\text{g}/\text{cockroach}$),
135 which was determined previously and in accordance with their protocol⁸. Mortality rate was
136 recorded 48 h after imidacloprid exposure.

137 6. Statistical analysis

138 All data were statistically analysed with a nonparametric Mann-Whitney test using GraphPad
139 Prism version 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Statistical analyses were
140 considered as significant for * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

141

142 Results

143 1. Effect of the ingestion of dsRNA targeting the $\beta 1$ nAChR subunit on the expression level of 144 nAChR subunits

145 First of all, the effect of dsRNA targeting the $\beta 1$ nAChR subunit was assessed on the expression
146 of the $\beta 1$ subunit but also on all the other subunits identified in the cockroach *P. americana*.
147 Thus, non-accommodated and accommodated cockroaches were treated by ingestion of 250 ng
148 of either dsRNA- $\beta 1$ or dsRNA-control. The quantification by qPCR experiments of the nAChR
149 subunit transcript level was performed on the TAG of the dsRNA-treated cockroaches 96 h

150 after this unique dsRNA ingestion (Fig. 1A). Therefore, we confirmed that dsRNA targeting
151 the $\beta 1$ nAChR subunit were able to specifically decrease $\beta 1$ mRNA expression. Indeed, a
152 significant decrease of the expression level of the $\beta 1$ subunit by 23% was found in non-
153 accommodated cockroaches treated with dsRNA- $\beta 1$ compared to those treated with dsRNA-
154 control (n=8 with 6 TAG per n, $p < 0.01$, Fig. 1B) and by 14% in accommodated cockroaches
155 (n=6 with 6 TAG per n, $p < 0.05$, Fig. 1C). Moreover, since no significant change in the transcript
156 level of the other nAChR subunits was observed, the specificity of the dsRNA- $\beta 1$ was validated
157 (Supplemental Fig. S1-S2). These results indicate for the first time that a single ingestion of
158 250 ng of dsRNA targeting the cockroach $\beta 1$ subunit effectively and significantly reduces the
159 expression of this subunit without observing off-target effect on the expression level of other
160 nAChR subunits.

Fig. 1

161 2. Effect of the ingestion of dsRNA- $\beta 1$ on the sensitivity to imidacloprid of cockroaches

162 To evaluate the potency of dsRNA- $\beta 1$ to modulate the imidacloprid sensitivity of the cockroach,
163 acute intoxication experiments to imidacloprid at LD_{50} were carried out on non-accommodated
164 and accommodated cockroaches which have ingested 250 ng of dsRNA (dsRNA-control or
165 dsRNA- $\beta 1$) (Fig. 2A). First, no change in mortality was observed in non-accommodated
166 cockroaches treated with dsRNA-control compared to those treated with dsRNA- $\beta 1$ (Fig. 2B).
167 When the mortality rate of the non-accommodated cockroaches which were treated with
168 dsRNA-control was compared to that of the cockroaches exposed to a sublethal dose of
169 imidacloprid for 30 days which were also treated by dsRNA-control (accommodated
170 cockroaches), this rate was reduced from 50% to 32% respectively (n=5 with 10 to 15
171 cockroaches per n, $p < 0.05$, Fig. 2B). Thus, in accordance with a previous study⁸, cockroaches
172 that were exposed for 30 days to a sublethal dose of imidacloprid were well accommodated and
173 less sensitive to this insecticide. Surprisingly, whereas the mortality rate of accommodated
174 cockroaches which were treated with dsRNA-control was 32%, the mortality rate of

175 accommodated cockroaches which were treated with dsRNA targeting $\beta 1$ subunit significantly
176 increased to 55% (n=5 with 10 to 15 cockroaches per n, $p < 0.01$, Fig. 2B). Furthermore, no
177 significant change in mortality rate was observed between cockroaches treated with dsRNA- $\beta 1$
178 and exposed or not to a sublethal dose of imidacloprid for 30 days (Fig. 2B) demonstrating that
179 accommodated cockroaches treated with dsRNA- $\beta 1$ shown the same imidacloprid sensitivity
180 as non-accommodated cockroaches. All together, these results demonstrated for the first time
181 that a unique ingestion of dsRNA- $\beta 1$ did not affect the sensibility of non-accommodated
182 cockroaches to this insecticide but allowed the accommodated cockroaches to revert to a
183 sensitive phenotype.

Fig. 2

184

185 Discussion

186 Until now, pest insect control has been mainly focused on chemical insecticides. However, the
187 appearance of insects less sensitive to insecticides and environmental concerns calls for the
188 need to develop new strategies to control pests. Beyond being used to study gene function,
189 RNAi has emerged as a promising most species-specific and eco-friendly alternative to manage
190 pests. In this study, we have investigated the use of RNAi that targets an nAChR subunit to
191 counteract insecticide accommodation. The nAChR1 and nAChR2 appear to play a role in the
192 development of accommodation mechanism to imidacloprid in the American cockroach *P.*
193 *americana* after exposure to a sublethal dose of this insecticide¹⁷. Thus, we have shown that
194 targeting the $\beta 1$ nAChR subunit found in these two nAChR subtypes with dsRNA allowed to
195 decrease effectively and specifically its expression. These results also suggest the implication
196 of systemic RNAi in the cockroach as it has been shown in other insect species²⁰⁻²³. However,
197 this mechanism is still not fully described in insects. In a second time, acute toxicity
198 experiments to imidacloprid on accommodated cockroaches showed, for the first time, that the
199 ingestion of dsRNA- $\beta 1$ can counter this phenomenon.

200 Surprisingly, the ingestion of dsRNA- β 1 did not involve change in the sensitivity of
201 non-accommodated cockroaches to imidacloprid. Indeed, it is well-known that the decrease
202 sensitivity to imidacloprid can be caused by target alteration and enhanced metabolism. Target-
203 site mutation in β 1 nAChR subunit and reduction of nAChR subunit expression such as β 1
204 subunit have been reported in many imidacloprid resistant insects^{11–13,24,25} suggesting that the
205 β 1 subunit play an important role in the sensitivity of insects to this insecticide. This has been
206 confirmed by the use of dsRNA that targets the Bo β 1 subunit of *Bradysia odoriphaga* which
207 induced a decrease in sensitivity to imidacloprid¹⁴. Moreover, a strain of *Drosophila*
208 *melanogaster* mutated on the D β 1 subunit sequence was also less sensitive to imidacloprid²⁶.
209 In addition, the reduced expression of the β 1 subunit was described in third instar larvae of
210 *Bradysia odoriphaga* that survived acute intoxication with imidacloprid¹⁴ and in resistant strain
211 of the aphid *Aphis gossypii*¹². However, such change of the β 1 subunit expression was not
212 observed in imidacloprid accommodated cockroaches which were exposed to a sublethal dose
213 of imidacloprid during 30 days¹⁷ suggesting that the β 1 subunit does not have the same impact
214 on sensitivity to imidacloprid in cockroaches as in other insects. Since cockroach nAChR1,
215 which is composed of the α 3, α 8 and β 1 subunits¹⁵, is sensitive to imidacloprid¹⁶ but the
216 ingestion of dsRNA- β 1 did not induce a change in sensitivity to imidacloprid in non-
217 accommodated cockroaches, we suggest that other imidacloprid-sensitive nAChR subtypes that
218 are not composed of the β 1 subunit could exist. This hypothesis is also supported by the fact
219 that the cockroach has one of the largest families of nAChR subunits²⁷ and that the
220 physiological role of many of them is still unknown.

221 The ingestion of dsRNA- β 1 by accommodated cockroaches to imidacloprid resulted in
222 a return to a sensitivity comparable to that of non-accommodated cockroaches. These results
223 suggest that maintaining the expression level of β 1 subunit is necessary for the cockroach to
224 resist another imidacloprid intoxication. Moreover, since the ingestion of dsRNA- β 1 did not

225 affect the expression of the other nAChR subunits, the hypothesis of nAChR compensation is
226 difficult to consider. In addition, it was suggested that the functionality of nAChR2 was
227 increased in accommodated cockroaches¹⁷. The increase in nAChR2 functionality would be
228 sufficient to allow cockroaches to accommodate to imidacloprid. This receptor subtype is
229 composed of $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\beta 1$ subunits¹⁵ and is insensitive to imidacloprid. Thus, altering the
230 expression of the $\beta 1$ subunit could at least impact the assembly of nAChR2 and allow a return
231 of the cockroach to a sensitive phenotype.

232 Finally, the use of dsRNA targeting $\beta 1$ subunit can be considered for other insects that
233 have a larger economic impact, such as the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. Indeed, aphid larvae
234 that survived an acute intoxication with imidacloprid showed a significant increase in the
235 expression of the $\beta 1$ subunit, suggesting its involvement in resistance to this insecticide²⁸.

236 In this study, we demonstrated for the first time that using dsRNA targeting an nAChR
237 subunit can counteract the accommodation mechanism to imidacloprid. These results could
238 contribute to develop sustainable insecticide resistance management strategies based on RNAi
239 that targets an nAChR subunit.

240

241 Acknowledgments

242 This work was supported by INRAE, Region Pays de la Loire, RFI Objectif Vegetal and SATT
243 Ouest Valorisation.

244

245 References

- 246 1) T. C. Sparks, N. Storer, A. Porter, R. Slater and R. Nauen: Insecticide resistance
247 management and industry: the origins and evolution of the I nsecticide R esistance A ction
248 C ommittee (IRAC) and the mode of action classification scheme. *Pest Manag. Sci.* **77**,
249 2609–2619 (2021).

- 250 2) A. Bantz, J. Camon, J.-A. Froger, D. Goven and V. Raymond: Exposure to sublethal doses
251 of insecticide and their effects on insects at cellular and physiological levels. *Curr. Opin.*
252 *Insect Sci.* **30**, 73–78 (2018).
- 253 3) O. Christiaens, S. Whyard, A. M. Vélez and G. Smagghe: Double-Stranded RNA
254 Technology to Control Insect Pests: Current Status and Challenges. *Front. Plant Sci.* **11**,
255 451 (2020).
- 256 4) J.-W. Qiao, Y.-L. Fan, B.-J. Wu, T.-T. Bai, Y.-H. Wang, Z.-F. Zhang, D. Wang and T.-X.
257 Liu: Downregulation of NADPH-cytochrome P450 reductase via RNA interference
258 increases the susceptibility of *Acyrtosiphon pisum* to desiccation and insecticides. *Insect*
259 *Sci.* **29**, 1105–1119 (2022).
- 260 5) X. Qu, S. Wang, G. Lin, M. Li, J. Shen and D. Wang: The Synergistic Effect of
261 Thiamethoxam and Synapsin dsRNA Targets Neurotransmission to Induce Mortality in
262 *Aphis gossypii*. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 9388 (2022).
- 263 6) K. Matsuda, M. Ihara and D. B. Sattelle: Neonicotinoid Insecticides: Molecular Targets,
264 Resistance, and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 241–255 (2020).
- 265 7) J. E. Casida: Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators:
266 Progress and Prospects. *Annu. Rev. Entomol.* **63**, 125–144 (2018).
- 267 8) A. Bantz, D. Goven, M. Siegwart, S. Maugin and V. Raymond: Exposure to a sublethal
268 dose of imidacloprid induces cellular and physiological changes in *Periplaneta americana*:
269 Involvement of $\alpha 2$ nicotinic acetylcholine subunit in imidacloprid sensitivity. *Pestic.*
270 *Biochem. Physiol.* **181**, 105014 (2022).
- 271 9) Y. Qu, J. Chen, C. Li, Q. Wang, W. Guo, Z. Han and W. Jiang: The subunit gene *Ld α 1* of
272 nicotinic acetylcholine receptors plays important roles in the toxicity of imidacloprid and
273 thiamethoxam against *Leptinotarsa decemlineata*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **127**, 51–58
274 (2016).

- 275 10) Y. Zhang, X. Wang, B. Yang, Y. Hu, L. Huang, C. Bass(↔) and Z. Liu: Reduction in mRNA
276 and protein expression of a nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 8$ subunit is associated with
277 resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J. Neurochem.*
278 **135**, 686–694 (2015).
- 279 11) C. Bass, A. M. Puinean, M. Andrews, P. Cutler, M. Daniels, J. Elias, V. L. Paul, A. J.
280 Crossthwaite, I. Denholm, L. M. Field, S. P. Foster, R. Lind, M. S. Williamson and R.
281 Slater: Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with resistance
282 to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neurosci.* **12**, 51 (2011).
- 283 12) X. Chen, F. Li, A. Chen, K. Ma, P. Liang, Y. Liu, D. Song and X. Gao: Both point mutations
284 and low expression levels of the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit are associated
285 with imidacloprid resistance in an *Aphis gossypii* (Glover) population from a Bt cotton field
286 in China. *Pestic. Biochem. Physiol.* **141**, 1–8 (2017).
- 287 13) K. Wang, M. Zhang, Y. Huang, Z. Yang, S. Su and M. Chen: Characterisation of
288 imidacloprid resistance in the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*, a serious pest on
289 wheat crops. *Pest Manag. Sci.* **74**, 1457–1465 (2018).
- 290 14) T. Shan, H. Zhang, C. Chen, A. Chen, X. Shi and X. Gao: Low expression levels of nicotinic
291 acetylcholine receptor subunits $Bo\alpha 1$ and $Bo\beta 1$ are associated with imidacloprid resistance
292 in *Bradysia odoriphaga*. *Pest Manag. Sci.* **76**, 3038–3045 (2020).
- 293 15) H. Sun, Y. Liu, J. Li, X. Cang, H. Bao and Z. Liu: The potential subunits involved in two
294 subtypes of α -Bgt-resistant nAChRs in cockroach dorsal unpaired median (DUM) neurons.
295 *Insect Biochem. Mol. Biol.* **81**, 32–40 (2017).
- 296 16) R. Courjaret and B. Lapied: Complex Intracellular Messenger Pathways Regulate One Type
297 of Neuronal α -Bungarotoxin-Resistant Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in
298 Insect Neurosecretory Cells (Dorsal Unpaired Median Neurons). *Mol. Pharmacol.* **60**, 80–
299 91 (2001).

- 300 17) Y. Benzidane, D. Goven, A. A. Abd-Ella, C. Deshayes, B. Lapied and V. Raymond:
301 Subchronic exposure to sublethal dose of imidacloprid changes electrophysiological
302 properties and expression pattern of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in insect
303 neurosecretory cells. *NeuroToxicology* **62**, 239–247 (2017).
- 304 18) J.-H. Huang, Y. Liu, Y.-H. Lin, X. Belles and H.-J. Lee: Practical Use of RNA Interference:
305 Oral Delivery of Double-stranded RNA in Liposome Carriers for Cockroaches. *J. Vis. Exp.*
306 **135**, e57385 (2018).
- 307 19) K. J. Livak and T. D. Schmittgen: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-
308 Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
- 309 20) R. Bolognesi, P. Ramaseshadri, J. Anderson, P. Bachman, W. Clinton, R. Flannagan, O.
310 Ilagan, C. Lawrence, S. Levine, W. Moar, G. Mueller, J. Tan, J. Uffman, E. Wiggins, G.
311 Heck and G. Segers: Characterizing the Mechanism of Action of Double-Stranded RNA
312 Activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLOS*
313 *ONE* **7**, e47534 (2012).
- 314 21) C. Ye, X.-S. Hu, Z.-W. Wang, D. Wei, G. Smaghe, O. Christiaens, J. Niu(✉) and J.-J.
315 Wang: Involvement of clathrin-dependent endocytosis in cellular dsRNA uptake in aphids.
316 *Insect Biochem. Mol. Biol.* **132**, 103557 (2021).
- 317 22) S. C. Miller, K. Miyata, S. J. Brown and Y. Tomoyasu: Dissecting Systemic RNA
318 Interference in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*: Parameters Affecting the
319 Efficiency of RNAi. *PLOS ONE* **7**, e47431 (2012).
- 320 23) Y. Luo, X. Wang, X. Wang, D. Yu, B. Chen and L. Kang: Differential responses of
321 migratory locusts to systemic RNA interference via double-stranded RNA injection and
322 feeding. *Insect Mol. Biol.* **22**, 574–583 (2013).

- 323 24) X. Xu, Q. Ding, X. Wang, R. Wang, F. Ullah, X. Gao and D. Song: V101I and R81T
324 mutations in the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit are associated with
325 neonicotinoid resistance in *Myzus persicae*. *Pest Manag. Sci.* **78**, 1500–1507 (2022).
- 326 25) I. Mezei, P. Valverde-Garcia, M. W. Siebert, L. E. Gomez, M. Torne, G. B. Watson, A. M.
327 Raquel, A. Fereres(↔) and T. C. Sparks: Impact of the nicotinic acetylcholine receptor
328 mutation R81T on the response of European *Myzus persicae* populations to imidacloprid
329 and sulfoxaflor in laboratory and in the field. *Pestic. Biochem. Physiol.* **187**, 105187 (2022).
- 330 26) T. Perry, W. Chen, R. Ghazali, Y. T. Yang, D. Christesen, F. Martelli, C. Lumb, H. N. Bao
331 Luong, J. Mitchell, J. K. Holien, M. W. Parker, T. C. Sparks and P. Batterham: Role of
332 nicotinic acetylcholine receptor subunits in the mode of action of neonicotinoid,
333 sulfoximine and spinosyn insecticides in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol.*
334 *Biol.* **131**, 103547 (2021).
- 335 27) A. K. Jones, D. Goven, J. Froger, A. Bantz and V. Raymond: The cys-loop ligand-gated
336 ion channel gene superfamilies of the cockroaches *Blattella germanica* and *Periplaneta*
337 *americana*. *Pest Manag. Sci.* **77**, 3787–3799 (2021).
- 338 28) E. Taillebois, A. Beloula, S. Quinchard, S. Jaubert-Possamai, A. Daguin, D. Servent, D.
339 Tagu, S. H. Thany and H. Tricoire-Leignel: Neonicotinoid Binding, Toxicity and
340 Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in the Aphid *Acyrtosiphon*
341 *pisum*. *PLOS ONE* **9**, Ed.e96669 (2014).

342

343 Figure legends

344 **Fig. 1.** Effect of the ingestion of dsRNA (dsRNA-control or dsRNA- $\beta 1$) on the $\beta 1$ nAChR
345 subunit mRNA expression level in non-accommodated and accommodated cockroaches. (A)
346 Schematic representation of the time course of the experiments. Cockroaches were exposed to
347 either a sublethal dose of imidacloprid for 30 days (Accommodated cockroaches) or its solvent

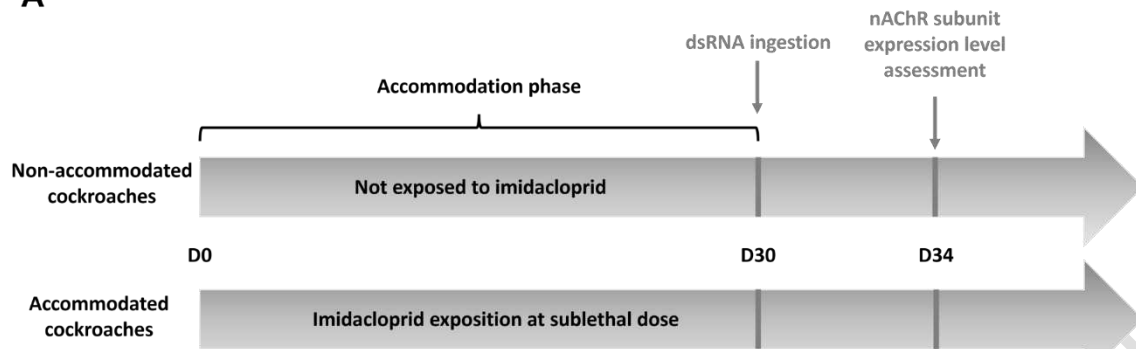
348 DMSO (Non-accommodated cockroaches). Then, each cockroach ingested 250 ng of either
349 dsRNA-control or dsRNA- β 1. The qPCR experiments were performed 96 h after dsRNA
350 ingestion (D34) on the terminal abdominal ganglia of non-accommodated (B) or accommodated
351 cockroaches (C). Data were normalized to the expression of the housekeeping gene actin with
352 the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, dsRNA-control vs dsRNA- β 1, nonparametric Mann-
353 Whitney test; $n = 6$ to 8 with 6 TAG per n). Data are shown as the mean \pm S.E.M..

354

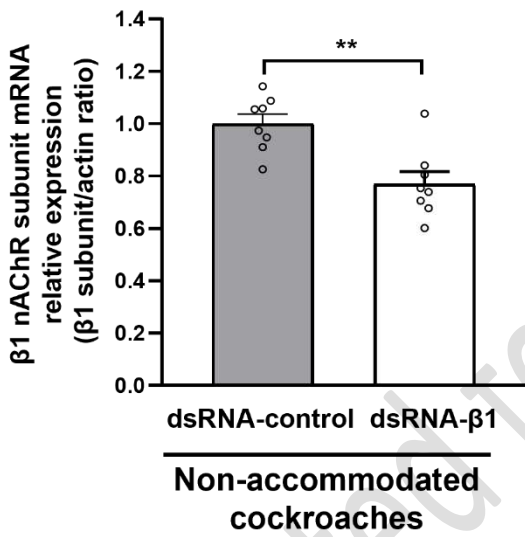
355 **Fig. 2.** Effect of dsRNA targeting β 1 subunit on the sensitivity to imidacloprid of
356 accommodated or non-accommodated cockroaches. (A) Schematic representation of the time
357 course of the experiments. Cockroaches were exposed to either a sublethal dose of imidacloprid
358 for 30 days ($0.025 \mu\text{g/day/cockroach}$; Accommodated cockroaches) or its solvent DMSO
359 (Non-accommodated cockroaches). Then, each cockroach ingested 250 ng of either dsRNA-
360 control or dsRNA- β 1 (D30). An acute intoxication with imidacloprid at LD_{50} (2.5
361 $\mu\text{g/cockroach}$) was performed 96 h after dsRNA ingestion (D34). (B) Mortality was assessed
362 48 h after acute imidacloprid exposure (D36). Data are shown as the mean \pm S.E.M. (ns: non-
363 significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, nonparametric Mann-Whitney test; $n = 5$ with 10 to 15
364 cockroaches per n).

Figure 1

A



B



C

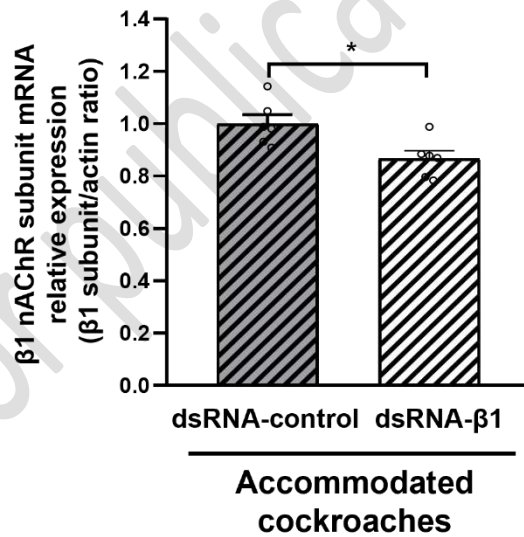
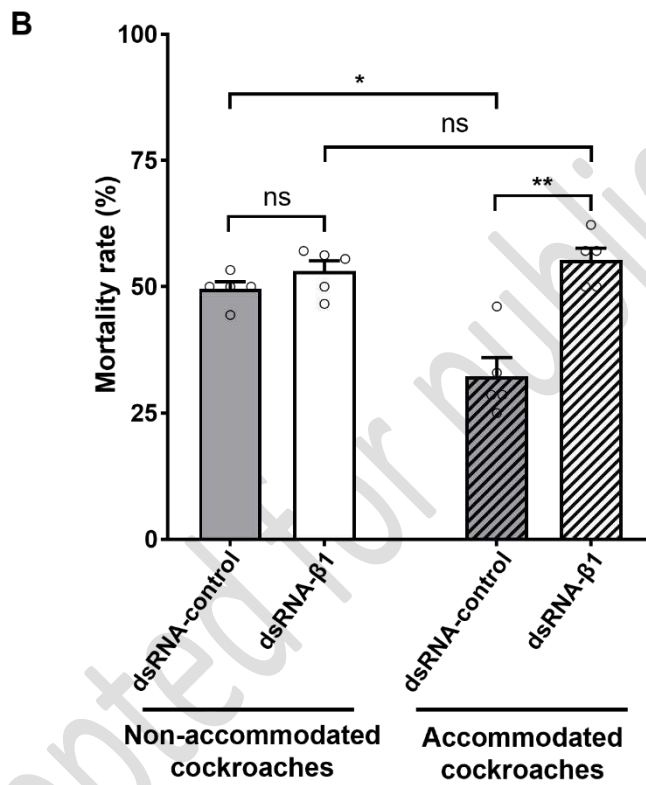
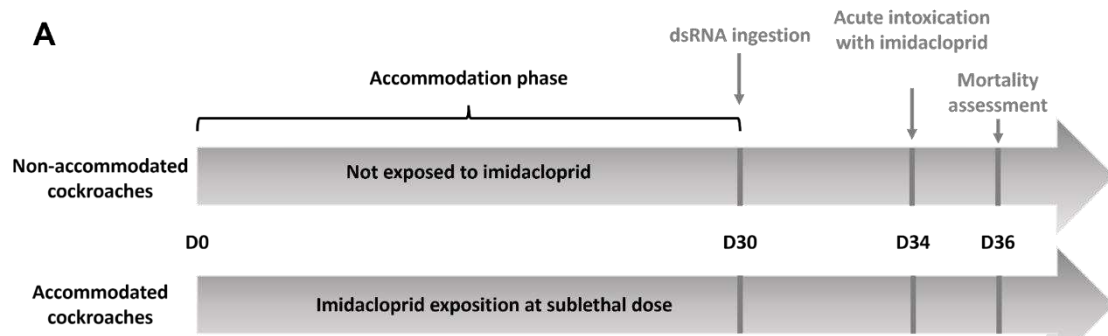


Figure 2



1 **Fig. S1.** Effect of the ingestion of dsRNA (dsRNA-control or dsRNA- β 1) on α (A) and other β (B)
2 nAChR subunit mRNA expression level in non-accommodated cockroaches. The qPCR experiments
3 were performed on the TAG 96 h after dsRNA ingestion. Data were normalized to the expression of the
4 housekeeping gene actin with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (dsRNA-control vs dsRNA- β 1, nonparametric Mann-
5 Whitney test; n=8 with 6 TAG per n). Data are shown as the mean \pm S.E.M..

6 **Fig. S2.** Effect of the ingestion of dsRNA (dsRNA-control or dsRNA- β 1) on α (A) and other β (B)
7 nAChR subunit mRNA expression level in accommodated cockroaches. The qPCR experiments were
8 performed on the TAG 96 h after dsRNA ingestion. Data were normalized to the expression of the
9 housekeeping gene actin with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (dsRNA-control vs dsRNA- β 1, nonparametric Mann-
10 Whitney test; n=6 with 6 TAG per n). Data are shown as the mean \pm S.E.M..

Accepted for publication

Figure S1

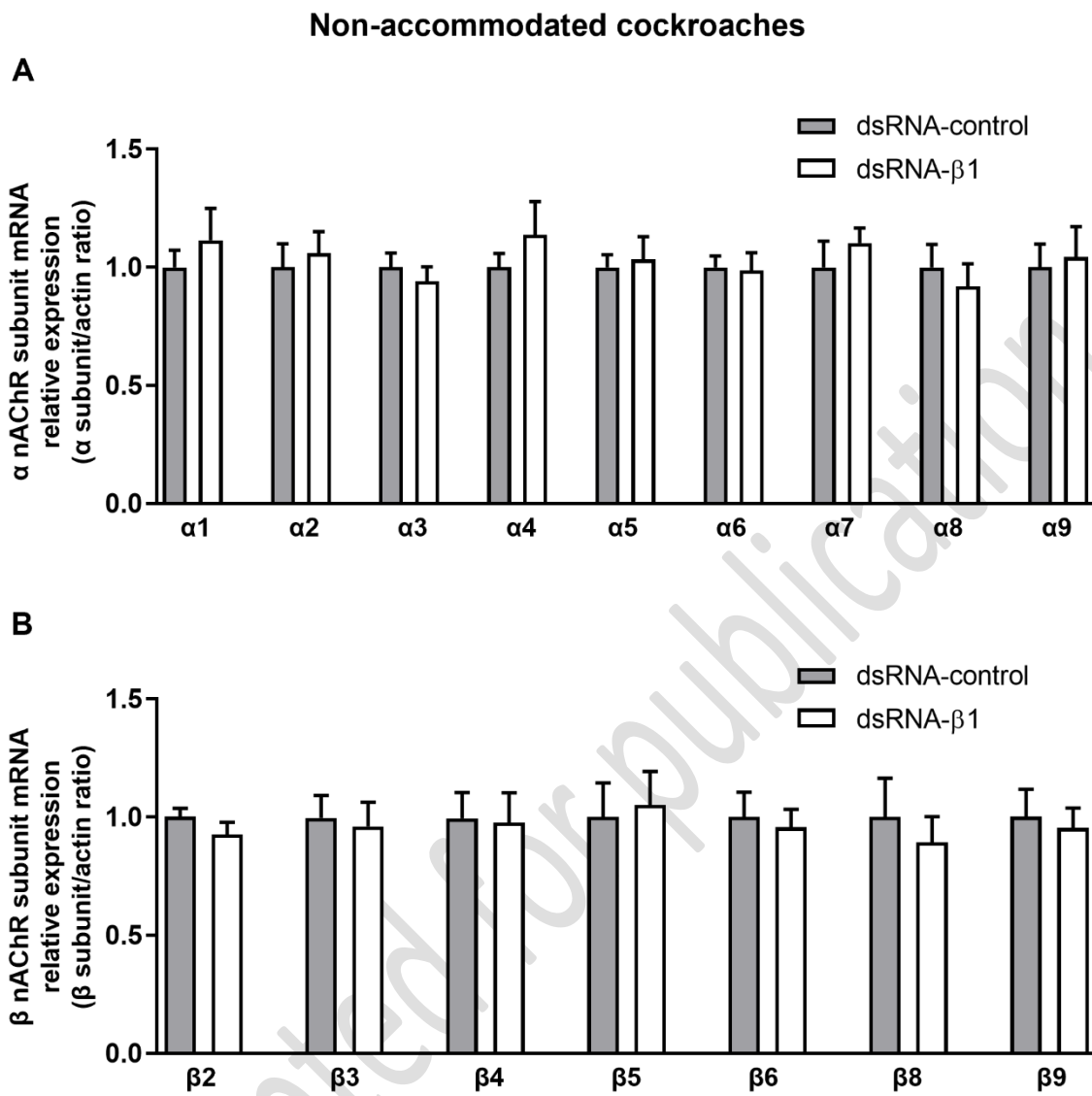
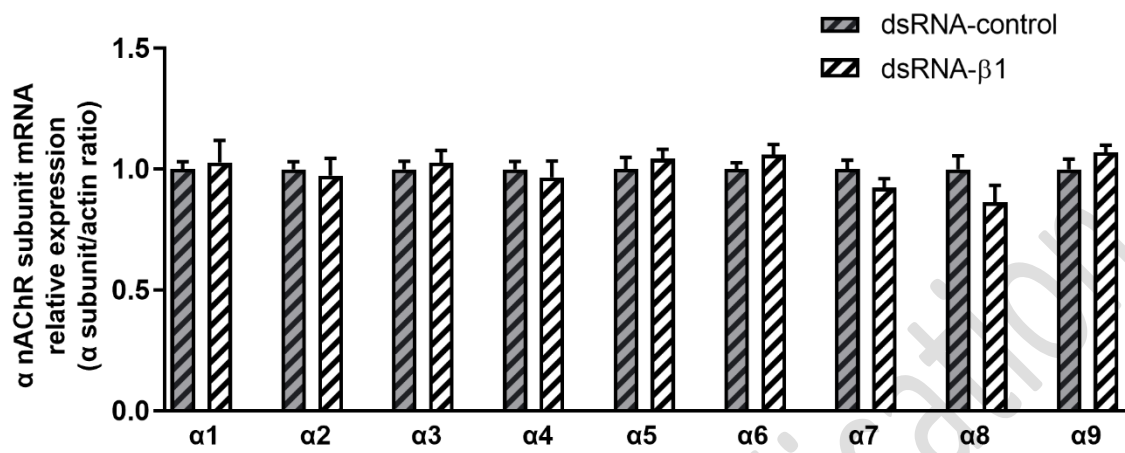


Figure S2

Accommodated cockroaches

A



B

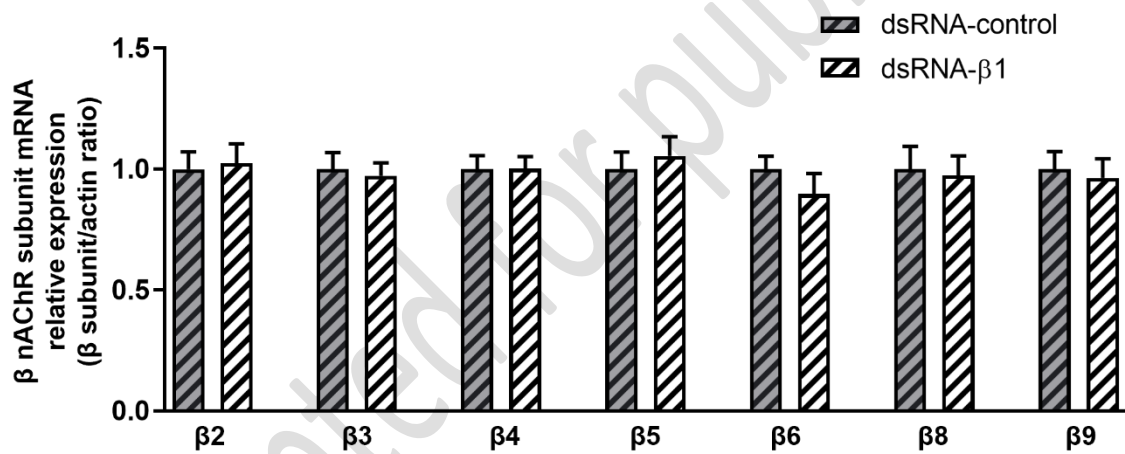


Table S1

Sequence of primers used for dsRNA production. The T7 RNA polymerase promoter sequence was indicated in italic and underlined.

	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
ds_β1	<u><i>TAATACGACTCACTATAGGG</i></u> CCGCCGCACCCCTC GTACGG	<u><i>TAATACGACTCACTATAGGGGGT</i></u> CCGACAGCTC CATCACC
ds_control	<u><i>TAATACGACTCACTATAGGG</i></u> GATGACCATGATTAC GCCAAG	<u><i>TAATACGACTCACTATAGGGT</i></u> GGCGGCCGTTAC TAGTGGA

Accepted for publication

Table S2

Sequence of primers used for amplification by quantitative PCR (qPCR) and the optimal annealing temperature. Accession number of all the nAChR subunits were found in Jones *et al.* (2021)²⁷.

Gene	Accession number	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Hybridization temperature (°C)
Actin	AY116670.1	GACTACTGGTATTGTGCTGG	AAAGCTGTAACCACGCTCAG	60
α1	JQ585634.1	AGGACTCTGTGGAGGACGAG	CTCCCGGTAGAGGCAGTGGT	60
α2	JQ585635.1	TAACAACCTCCATCTCATGCC	GATCTTGCCACTCATGTTCC	60
α3	JQ609337.1	CGACACCTTCAGCATTTGTG	GCAGATGAACCCGCTAGACT	60
α4	JN390946.1	GTGTTGATGCGTACAGTGAG	AGACAGGTCATCCTTTGTAG	60
α5	GFCQ01005211.1	GTGTGAGAGGAACCGGTGTT	ATCCCTTCGTTGTCTGCTG	60
α6	JF731243.1	TGACCATCTTGCTCTCGT	CGACTCATTCCGAGAATC	60
α7	MW201211.1	CAATTGCAAGACGACACC	ATGGAGGCGATGAGAACA	65
α8	MW201212.1	ACGTGTTGTCCGCACTCA	TATCCGGAGGAACCTGGAAG	60
α9	MW201214.1	ACCACGGTCGTCAATATCGG	CGCGAGACAATGGGTGTTTC	60
β1	MW201213.1	GGTGACCAAGTGTCCCTTAG	ATGATTGCCCTCGTAGATG	65
β2	GFCQ01032711.1	ACAAGGGCGACATACAGGTG	GCAGGTTTCGGTTCACAAG	60
β3	GFCQ01027461.1	TCGTCGTCATTCTGCACTC	GCAGGACCCGCATATCATCA	60
β4	GAWS02039241.1	CTTGCGGTGTTCAACCAGTG	CAGCTGACATCTCCTGGCA	60
β5	GFCQ01009686.1	GAGAACACGAGGTGTCTGGT	CAGCTAGACGCGACAGAGAA	60
β6	GFCQ01010089.1	AGTCGCACAGTTTGCTACGA	AGGAGCAGTTCACCTTGTCG	60
β8	GFCQ01034959.1	TGTTTCGATGGTTGCGGTGTA	TGTCGAGGTTGCAGACAACA	60
β9	GBJC01015771.1	TCCGGACGTCTACTCCACAG	GACAACATCCACAGCTGCAA	60

Etude 4 : Evaluation de l'implication de la sous-unité nicotinique Pamea7 dans la sensibilité à l'imidaclopride de la blatte *Periplaneta americana* (étude préliminaire)

1. Contexte et objectifs de l'étude

Le développement de nouvelles stratégies de gestion durable de l'accommodation aux insecticides passe par la compréhension des mécanismes impliqués dans sa mise en place. La sensibilité des protéines cibles des insecticides peut être modulée par divers mécanismes cellulaires et moléculaires. Notamment, la modification de la composition en sous-unités nicotiques des nAChRs peut influencer leurs propriétés électrophysiologiques, pharmacologiques ainsi que leur sensibilité aux insecticides (Raymond *et al.*, 2017). De plus, plusieurs études s'attardent sur l'implication de la variation de la concentration calcique intracellulaire dans la modulation de la sensibilité aux insecticides (Apaire-Marchais *et al.*, 2016; Deshayes *et al.*, 2018). Les nAChRs d'insectes présentent notamment de nombreux sites de phosphorylation sur lesquels peuvent survenir des phosphorylations ou déphosphorylations par des voies de signalisation intracellulaires dépendantes du calcium et ainsi moduler leur sensibilité aux néonicotinoïdes (Thany *et al.*, 2007; Raymond *et al.*, 2017). De plus, il a précédemment été rapporté que la concentration calcique intracellulaire basale des neurones DUM issus de DGAs de blattes *Periplaneta americana* accommodées à l'IMI après une exposition à une dose sublétales de cet insecticide était augmentée. Dans cette étude, les auteurs ont suggéré que cette augmentation de la concentration calcique intracellulaire pourrait impliquer d'éventuelles modifications des voies de signalisation intracellulaires dépendantes du calcium et ainsi moduler la réponse des nAChR1 et nAChR2 à différents agonistes (Benzidane *et al.*, 2017). Au laboratoire SiFCIR, une étude préliminaire du transcriptome, par RNA-seq, de DGAs issus de ces blattes accommodées a permis d'identifier des modifications d'expression des sous-unités nicotiques comme la sous-unité nicotinique Pamea7 (Bantz, 2020). A l'heure actuelle, peu d'informations sont disponibles sur les nAChRs d'insectes composés de la sous-unité $\alpha 7$ contrairement au nAChR homomérique $\alpha 7$ de mammifère qui a pour particularité d'être fortement perméable au calcium (Gotti et Clementi, 2004; Albuquerque *et al.*, 2009) mais également d'être sensible à l' α -bungarotoxine (α -bgt). De plus, la séquence nucléotidique de la sous-unité Da7 de la mouche *Drosophila melanogaster* présente une forte homologie avec celle des mammifères (Jones *et al.*, 2007a). Ainsi, chez les insectes, ces nAChRs composés de la sous-unité $\alpha 7$ pourraient être la cible d'insecticides mais aussi un modulateur potentiel des cibles aux insecticides *via* l'activation de voies de signalisation dépendantes du calcium. En ce sens, l'objectif de cette étude est d'évaluer l'implication de la sous-unité nicotinique Pamea7 dans la sensibilité de la blatte à l'IMI en mimant la diminution d'expression de cette sous-unité retrouvée chez des blattes accommodées à cet insecticide à l'aide de l'ingestion de dsRNAs (dsRNA-Pamea7). Puis, afin d'élucider les mécanismes responsables de cette diminution de sensibilité, l'impact de l'ingestion des dsRNA-Pamea7 sur les niveaux d'expression des autres sous-unités nicotiques identifiées chez la blatte mais également sur la perméabilité calcique des nAChRs présents sur les neurones DUM de la blatte est évalué. Pour ce faire, nous avons voulu déterminer dans un premier temps si les nAChRs des neurones DUM de blattes sont perméables au calcium puis d'évaluer leur

sensibilité à l' α -bgt par la technique d'imagerie calcique. Dans un second temps, nous avons déterminé si cette réponse calcique est impactée par l'utilisation de dsRNA-Pamea7 également grâce à la technique d'imagerie calcique.

2. Effet des dsRNA-Pamea7 sur l'expression des transcrits de la sous-unité nicotinique Pamea7

Afin de mimer la diminution d'expression de la sous-unité Pamea7 observée chez des blattes accommodées à l'IMI après une exposition à une dose sub létale de cet insecticide, des dsRNAs qui ciblent cette sous-unité sont utilisés (dsRNA-Pamea7). Pour évaluer leur efficacité, la quantification par qPCR du niveau d'expression de la sous-unité Pamea7 dans le DGA de blatte est réalisée 96h après l'ingestion de 500ng de lipoplexes contenant les dsRNA-Pamea7. Une diminution de 50% du niveau d'expression des transcrits de cette sous-unité est observée chez les blattes traitées avec les dsRNA-Pamea7 par rapport aux blattes contrôles (dsRNA-LacZ) (figure 42). Ainsi, l'efficacité des dsRNA-Pamea7 est validée à 96h.

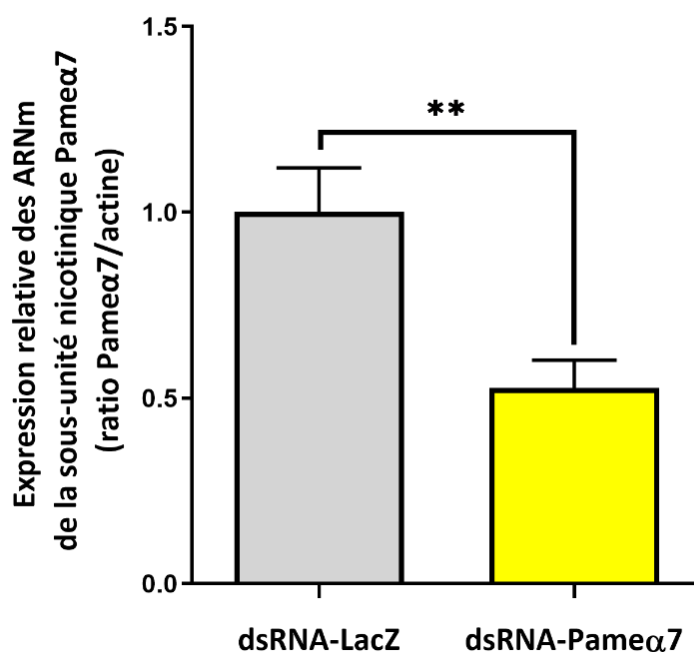


Figure 42 : Quantification par qPCR de l'expression des transcrits de la sous-unité nicotinique Pamea7 dans les DGAs provenant de blattes *Periplaneta americana* 96h après l'ingestion des dsRNAs d'intérêt (dsRNA-LacZ ou dsRNA-Pamea7). L'expression relative est normalisée avec le gène de l'actine (gène de référence) selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (** $p < 0,01$; dsRNA-Pamea7 vs dsRNA-LacZ ; test non-paramétrique de Mann-Whitney ; $n = 6$ à 8 avec 6 DGAs par n).

3. Evaluation de l'effet de l'ingestion des dsRNA-Pamea7 sur la sensibilité de la blatte à l'imidaclopride

Afin d'évaluer l'impact de l'ingestion de dsRNA-Pamea7 sur la sensibilité de la blatte à l'IMI, des expériences préliminaires d'intoxication aiguë à cet insecticide couplée à l'ingestion des dsRNAs d'intérêt ont été réalisées. Pour ce faire, 96h après l'ingestion de 500ng de lipoplexes contenant les dsRNA-Pamea7 ou les dsRNA-LacZ, les blattes sont intoxiquées à l'IMI à une dose de 2,5µg/blatte. La mortalité est ensuite évaluée à 24h, 48h, 72h et 96h (figure 43). Ainsi, une diminution significative de la mortalité d'environ 15% à 48h est observée. Ces résultats suggèrent une implication directe ou indirecte de la sous-unité Pamea7 dans la sensibilité de la blatte à l'IMI. En effet, la sous-unité Pamea7 pourrait composer des nAChRs sensibles à l'IMI ou la diminution d'expression de cette sous-unité après l'ingestion de dsRNA-Pamea7 pourrait engendrer des modifications cellulaires et/ou moléculaires qui altereraient la sensibilité des blattes à cet insecticide.

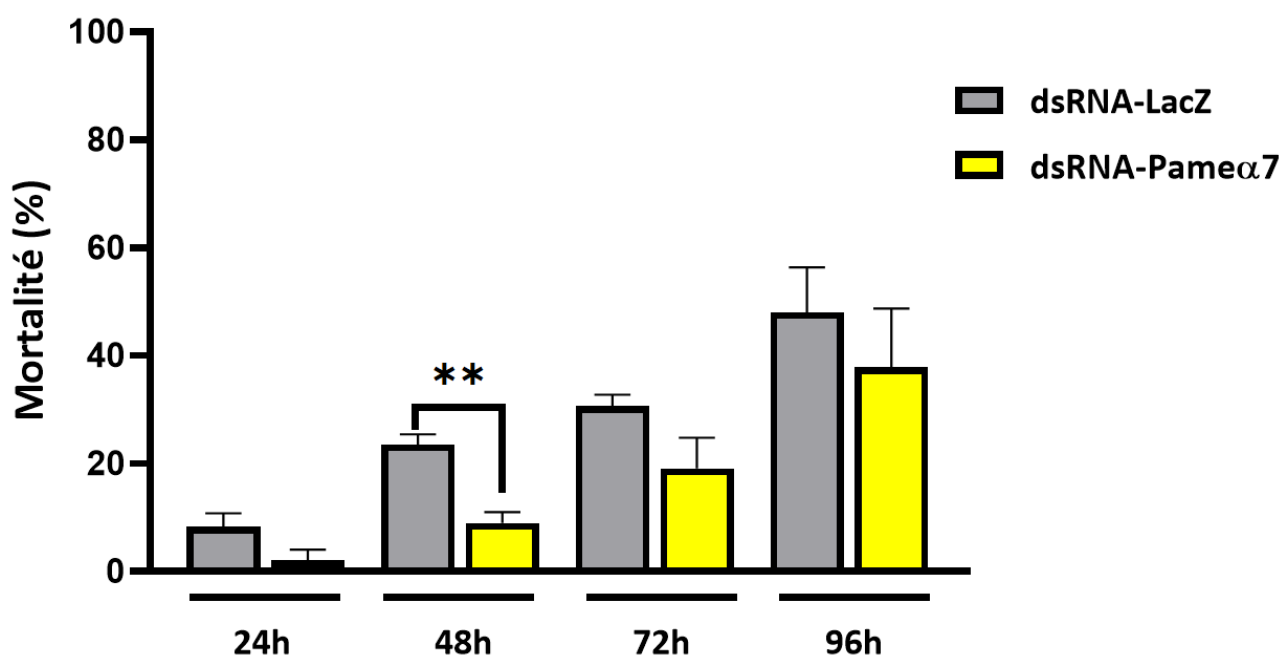


Figure 43 : Histogrammes représentant le pourcentage de mortalité des blattes ayant ingéré les dsRNAs d'intérêt (dsRNA-LacZ ou dsRNA-Pamea7) à 24h, 48h, 72h et 96h après l'intoxication aiguë à l'imidaclopride à une dose de 2,5µg/blatte (**p<0,01 ; dsRNA-Pamea7 vs dsRNA-LacZ, test non-paramétrique de Mann-Whitney ; n=4 à 5 avec 10 à 15 blattes par n).

4. Quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la diminution de sensibilité des blattes à l'imidaclopride après l'ingestion de dsRNA-Pamea7 ?

4.1. Impact de l'ingestion des dsRNA-Pamea7 sur l'expression des autres sous-unités nicotiniques identifiées chez la blatte

Comme décrit en introduction de cette étude, les propriétés électrophysiologiques, pharmacologiques ainsi que la sensibilité des nAChRs aux insecticides peuvent être modifiées selon leur composition en sous-unités nicotiniques (Raymond *et al.*, 2017). De plus, la modification d'expression d'une sous-unité nicotinique chez l'insecte peut engendrer l'apparition de phénomènes de compensation par des modifications de l'expression des autres sous-unités nicotiniques (Qu *et al.*, 2016; Perry *et al.*, 2021; Komori *et al.*, 2023). En ce sens, l'objectif est de déterminer si un tel phénomène apparaît chez des blattes qui ont ingéré des dsRNA-Pamea7. La quantification par qPCR des niveaux d'expression de certaines sous-unités nicotiniques identifiées chez la blatte a donc été réalisée dans le DGA de blattes 96h après le traitement avec les lipoplexes contenant les dsRNAs d'intérêt de ces dernières. Ainsi, une diminution de l'expression des sous-unités Pamea3, Pamea6, Pamea9 et Pameβ1 a pu être observée (figure 44). Cependant, la quantification par qPCR des autres sous-unités nicotiniques identifiées chez la blatte, à savoir Pamea5, Pameβ2-Pameβ6, Pameβ8, Pameβ9, reste encore à faire.

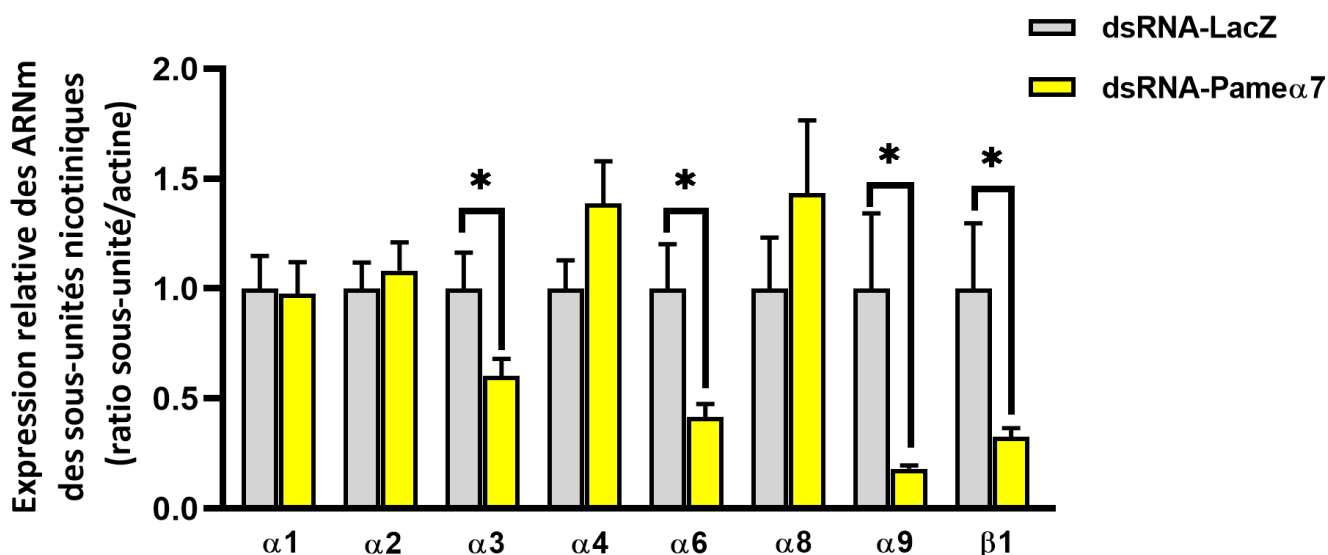


Figure 44 : Quantification par qPCR de l'expression des transcrits des sous-unités nicotiniques Pamea1, Pamea2, Pamea3, Pamea4, Pamea6, Pamea8, Pamea9 et Pameβ1 dans les DGAs issus de blattes *Periplaneta americana* ayant ingéré les dsRNA-Pamea7 ou les dsRNA-LacZ 96h auparavant. L'expression relative est normalisée avec le gène de l'actine (gène de référence) selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (* $p < 0,05$; dsRNA-Pamea7 vs dsRNA-LacZ ; test de Mann-Whitney ; $n = 6$ à 10 avec 6 DGAs par n).

4.2. Impact de l'ingestion des dsRNA-Pamea7 sur la réponse calcique des nAChRs des neurones DUM de blattes

4.2.1. Evaluation de la réponse calcique des nAChRs présents sur les neurones DUM de la blatte

Dans un premier temps, l'objectif est d'évaluer s'il existe des nAChRs perméables au calcium sur les neurones DUM retrouvés dans le DGA de la blatte grâce à la technique d'imagerie calcique. Etant donné que l'activation des nAChRs par un agoniste, comme la NIC, induit une dépolarisation membranaire, les canaux calciques dépendants du potentiel vont s'ouvrir et permettre l'entrée de calcium. Ainsi, pour uniquement étudier la réponse calcique directement liée à l'ouverture des nAChRs, un bloqueur des canaux calciques dépendants du potentiel, le chlorure de cobalt (CoCl_2), a été utilisé durant toutes les expériences d'imagerie calcique. Après un prétraitement des neurones DUM avec du CoCl_2 ($3 \cdot 10^{-3}\text{M}$) durant trois minutes, une solution de NIC à la concentration de 10^{-5}M a été appliquée sur les neurones DUM pendant 30 secondes. Dans ces conditions, l'application de NIC entraîne l'apparition d'une réponse calcique illustrée par une augmentation du ratio 340nm/380nm (figure 45). Ces résultats montrent que l'activation des nAChRs par l'application de NIC induit une augmentation du calcium cytoplasmique des neurones DUM. En moyenne, le ratio 340nm/380nm croît d'environ 0,025 en réponse à l'application de nicotine (10^{-5}M). Ainsi, ces premiers éléments suggèrent qu'il existe des récepteurs nicotiniques exprimés sur les neurones DUM chez les blattes *Periplaneta americana* qui sont perméables au calcium.

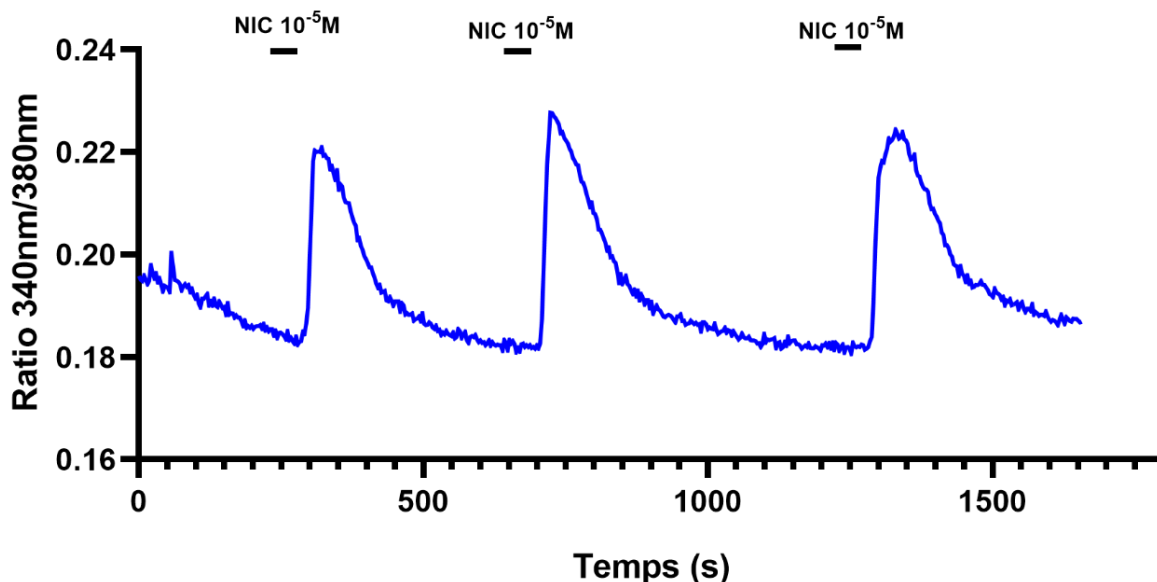


Figure 45 : Exemple de tracé représentant la variation du ratio 340nm/380nm au cours du temps après un prétraitement de CoCl_2 à $3 \cdot 10^{-3}\text{M}$, puis une application de NIC à 10^{-5}M sur les neurones DUM.

4.2.2. Evaluation de la sensibilité à l' α -bgt des nAChRs des neurones DUM de blatte

Etant donné que, sur les neurones DUM de blattes, il a été mis en évidence la présence de certains nAChRs sensibles ainsi que d'autres insensibles à l' α -bgt et sachant que le récepteur nicotinique homomérique $\alpha 7$ de mammifère est sensible à l' α -bgt, l'expérience suivante vise à déterminer si les nAChRs perméables au calcium sont sensibles à cette toxine. Dans cette optique, les neurones DUM ont reçu un prétraitement pendant trois minutes avec une solution de CoCl_2 (3.10^{-3}M) et d' α -bgt (5.10^{-7}M). Puis, une solution de NIC (10^{-5}M) a été appliquée durant 30 secondes afin d'évaluer la réponse calcique (figure 46A). L'amplitude de cette réponse sera comparée à celle obtenue sur des neurones DUM prétraités uniquement avec du CoCl_2 (figure 46B). Cette expérience a mis en évidence une diminution significative d'environ 80% de la réponse calcique des nAChRs présents sur les neurones DUM des blattes *Periplaneta americana*, lorsque ces derniers sont exposés à une solution d' α -bgt (5.10^{-7}M). Ainsi, les nAChRs exprimés sur les neurones DUM et perméables au calcium sont majoritairement sensibles à l' α -bgt.

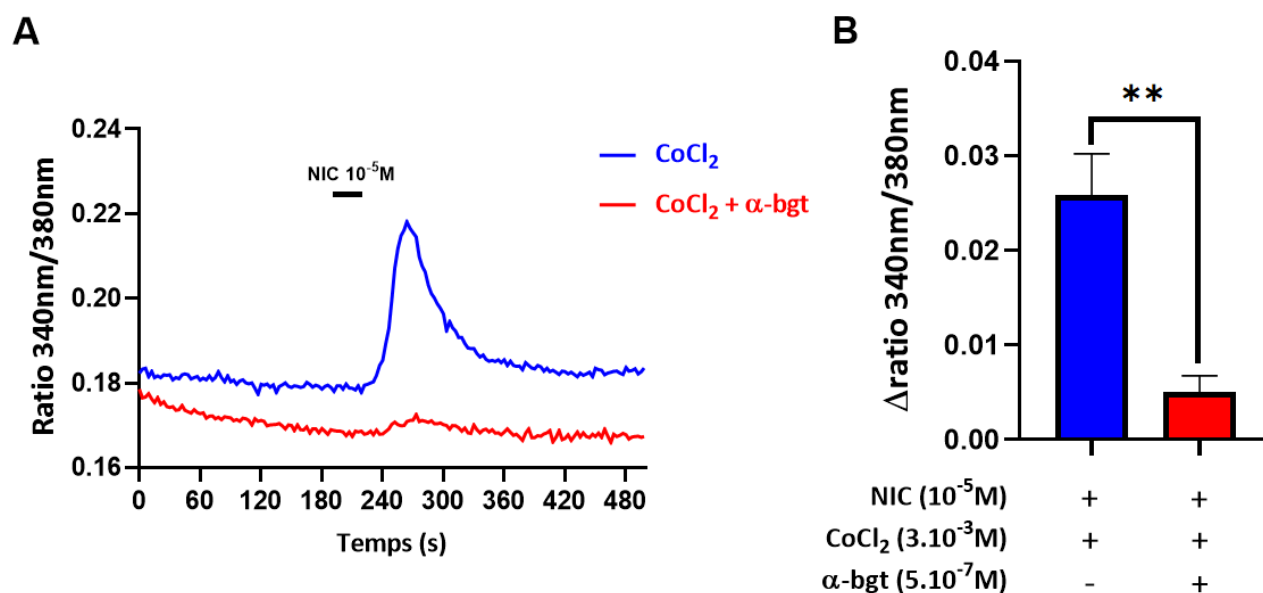


Figure 46 : Effet de l' α -bungarotoxine (α -bgt) sur la réponse calcique des nAChRs des neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana*. (A) Exemple de tracés représentant la variation du ratio 340nm/380nm en réponse à une application de nicotine (NIC) à 10^{-5}M durant trente secondes sur des neurones DUM prétraités avec du CoCl_2 (3.10^{-3}M) (**bleu**) ou du CoCl_2 (3.10^{-3}M) et de l' α -bgt (5.10^{-7}M) (**rouge**). (B) Histogramme représentant la variation moyenne du ratio 340nm/380nm obtenue suite à l'application de NIC à 10^{-5}M sur des neurones DUM prétraités avec du CoCl_2 à 3.10^{-3}M . La comparaison est effectuée entre des neurones DUM non traités à l' α -bgt et ceux traités avec de l' α -bgt à 5.10^{-7}M (** $p < 0,01$; test non-paramétrique de Mann-Whitney ; $n = 5$ à 6).

4.2.3. Effet de l'ingestion de dsRNA-Pamea7 sur la réponse calcique des neurones DUM de blatte

Afin de déterminer si la diminution de la sensibilité à l'IMI des blattes ayant ingéré des dsRNA-Pamea7 peut être due à une modification de la perméabilité calcique des nAChRs, des expériences en imagerie calcique sur des neurones DUM de blattes ayant ingéré ces dsRNAs sont réalisées. Ainsi, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire en réponse à la NIC est évaluée dans des neurones DUM issus de blattes

ayant ingéré des dsRNA-Pamea7 ou des dsRNA-LacZ. Ces expériences en imagerie calcique sont réalisées 120h après l'ingestion des dsRNAs d'intérêt. Les neurones DUM ont tout d'abord reçu un prétraitement avec du CoCl_2 (3.10^{-3}M) durant trois minutes. Postérieurement, leur réponse à la NIC (10^{-5}M) a été évaluée. Ces premiers résultats ($n=6$) semblent indiquer que l'ingestion de dsRNA-Pamea7 n'induit pas de différence significative de la réponse calcique des neurones DUM en réponse à la nicotine (figure 47). Etant donné qu'une disparité de réponse et qu'un éventuel effet de série sont observés, un nombre de répétition supplémentaire est requis pour affiner et confirmer ces résultats.

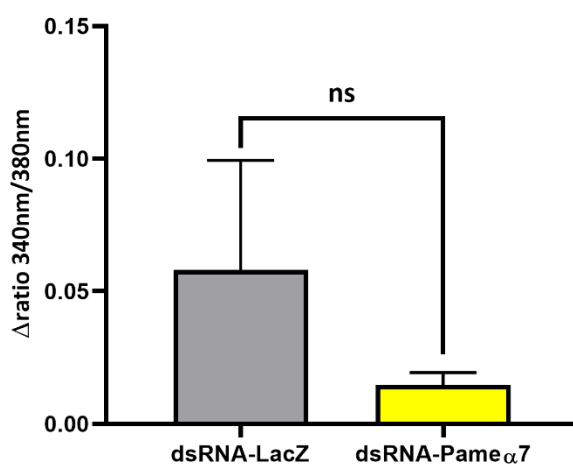


Figure 47 : Histogramme représentant la variation moyenne du ratio 340nm/380nm après un prétraitement avec du CoCl_2 à 3.10^{-3}M , puis une exposition à la NIC à 10^{-5}M des neurones DUM issus de blattes qui ont ingéré des dsRNA-LacZ ou des dsRNA-Pamea7 (ns = non significatif ; test non-paramétrique de Mann-Whitney ; $n=6$).

5. Discussion

L'identification de cibles potentielles et pertinentes de l'ARNi pour contourner les phénomènes d'accommodation aux insecticides passe par la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. Le premier objectif de cette étude préliminaire était de mimer la diminution de l'expression de la sous-unité Pamea7 retrouvée chez des blattes *Periplaneta americana* accommodées à l'IMI après une exposition à une dose sub létale de cet insecticide. Pour ce faire, nous avons démontré que l'ingestion de dsRNA-Pamea7 permet de diminuer efficacement le niveau d'expression de la sous-unité nicotinique Pamea7 dans le DGA de la blatte. De plus, l'ingestion de ces dsRNAs semble induire une diminution de la sensibilité des blattes à l'IMI suggérant une implication directe ou indirecte de la sous-unité nicotinique Pamea7 dans la sensibilité de cet insecte à cet insecticide. Une étude précédente a également validé l'implication d'une autre sous-unité nicotinique, Pamea2, dans la sensibilité de la blatte à l'IMI en utilisant la technique d'ARNi (Bantz *et al.*, 2022). De plus, dans le cas de la blatte *Periplaneta americana* accommodée à l'IMI après une exposition à une dose sub létale de cet insecticide, des modifications transcriptionnelles (Benzidane *et al.*, 2017; Bantz, 2020; Bantz *et al.*, 2022), des modifications fonctionnelles des nAChR1 et nAChR2 ainsi qu'une augmentation du niveau basal du calcium intracellulaire (Benzidane *et al.*, 2017) ont été rapportées suggérant la pluralité des acteurs et des

mécanismes clés dans la diminution de la sensibilité à l'IMI de ces insectes. Cependant, la diversité et la complexité de ces mécanismes rendent difficile leur élucidation. En ce sens, la modification ponctuelle du niveau d'expression des protéines cibles des insecticides par l'utilisation de dsRNAs pourrait faciliter l'obtention d'insectes moins sensibles aux insecticides et ainsi permettre l'étude des mécanismes sous-jacents au phénomène d'accommodation. Dans cette étude, afin d'élucider les mécanismes impliqués dans la diminution de sensibilité des blattes qui ont ingéré des dsRNA-Pamea7, nous avons montré, par qPCR, une diminution significative de l'expression des sous-unités nicotiniques Pamea3, Pamea6, Pamea9 et Pameβ1. Ainsi, la modification du profil d'expression des sous-unités nicotiniques de blattes après l'ingestion de dsRNA-Pamea7 pourrait impliquer des modifications de la composition en sous-unités des nAChRs exprimés à la membrane et ainsi moduler leur sensibilité à l'IMI. En revanche, comme nous n'avons observé que des diminutions d'expression des sous-unités nicotiniques et qu'il reste des sous-unités dont l'expression n'a pas encore été quantifiée par qPCR chez les blattes ayant ingéré des dsRNA-Pamea7, il est encore difficile de déterminer s'il s'agit d'un phénomène de compensation. En parallèle, sachant que la variation de la concentration calcique intracellulaire module la sensibilité des protéines cibles aux insecticides (Apaire-Marchais *et al.*, 2016; Deshayes *et al.*, 2018), nous avons évalué l'impact de l'ingestion des dsRNA-Pamea7 sur la réponse calcique des nAChRs présents sur les neurones DUM de la blatte par imagerie calcique. Nos résultats préliminaires ne nous permettent pas encore de conclure avec certitude. Cependant, l'ingestion des dsRNA-Pamea7 ne semble pas impacter la perméabilité calcique des nAChRs des neurones DUM de la blatte. De plus, le manque de connaissances sur les nAChRs natifs d'insectes composés de la sous-unité α7 rend difficile la discussion de ces résultats. En effet, bien que chez les mammifères les nAChRs les plus perméables au calcium sont les nAChRs homomériques α7 qui sont connus pour être sensibles à l'α-bgt (Zoli *et al.*, 2015), l'expression d'un nAChR recombiné homomérique Pamea7 en ovocyte de xénope a permis de suggérer que ce récepteur serait insensible à l'α-bgt (Cartereau *et al.*, 2020). En ce sens, dans nos expériences, la réponse calcique restante après l'application d'α-bgt pourrait, entre autres, être liée à la présence d'un récepteur homomérique Pamea7. Ainsi, les nAChRs d'insectes composés de la sous-unité α7 pourraient présenter des propriétés fonctionnelles et pharmacologiques différentes par rapport aux nAChRs de mammifères également composés de cette sous-unité.

Pour conclure, au vu des résultats préliminaires présentés, il est difficile d'identifier une cible potentielle de l'ARNi pour contourner le mécanisme d'accommodation à l'IMI autre que la sous-unité nicotinique Pameβ1 présentée dans la troisième étude de ce manuscrit.

Discussion générale et perspectives

1. L'utilisation de la technique d'interférence ARN qui cible les acteurs du système cholinergique peut-elle être envisagée pour lutter contre les insectes ravageurs ?

La crise démographique actuelle soulève de nombreuses questions quant à nos systèmes de production agricole et aux stratégies de protection des cultures contre les insectes ravageurs qui sont principalement basées sur l'utilisation d'insecticides neurotoxiques. Parmi ces derniers, un grand nombre de familles d'insecticides agissent sur le système cholinergique comme les néonicotinoïdes qui agissent sur les récepteurs nicotiques (nAChRs) ou encore les carbamates qui ciblent l'acétylcholinestérase (AChE ; Casida et Durkin, 2013a). Cependant, les effets néfastes des insecticides sur l'environnement et les organismes non-cibles tels que l'Homme ou certains insectes bénéfiques ont conduit à la nécessité de repenser ces stratégies de lutte basées sur l'utilisation de ces composés ou de les substituer par des outils innovants plus respectueux de l'écosystème dans lequel ils sont répandus. Parmi ces nouvelles stratégies de lutte innovantes, l'interférence ARN (ARNi) apparaît comme une stratégie de choix pour contrôler spécifiquement les insectes ravageurs (Christiaens *et al.*, 2020). En particulier, l'utilisation de dsRNAs (« Double-stranded RNA » ou ARN double brin) dirigés contre des gènes importants dans la physiologie et la survie des insectes a pu être abordée dans la littérature. En ce sens, l'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer l'utilisation de la technique d'ARNi dirigée contre les acteurs du système cholinergique pour lutter contre les insectes ravageurs. Pour la première fois, nous avons démontré que des dsRNAs qui ciblent une sous-unité nicotinique divergente, Apisum β 2, présentent un effet insecticide sur un insecte ravageur de culture, le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* et qu'ils peuvent être utilisés en combinaison avec un insecticide néonicotinoïde, l'imidaclopride (IMI). De la même manière, il semblerait que des dsRNAs qui ciblent l'AChE de type 1 présentent également un effet insecticide sur ces ravageurs de cultures. En ce sens, ces résultats permettent de valider que les dsRNAs qui ciblent les acteurs du système cholinergique, en particulier les sous-unités nicotiques qui composent les nAChRs et l'AChE, pourraient être utilisés comme agent de biocontrôle ou en complément de l'utilisation d'un insecticide pour réduire les doses répandues en champs.

L'apparition de phénomènes de résistance et d'accommodation aux insecticides par une pression de sélection est aujourd'hui responsable d'une diminution globale de l'efficacité des insecticides. L'utilisation de la technique d'ARNi pour contourner les mécanismes de résistance a déjà pu être rapportée (Killiny *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). Dans ce travail, nous avons démontré pour la première fois, que l'utilisation de dsRNAs qui ciblent la sous-unité nicotinique Pame β 1 a permis de restaurer la sensibilité à l'IMI des blattes *Periplaneta americana* initialement accommodées à cet insecticide. Ainsi, la technique d'ARNi qui cible une sous-unité nicotinique pourrait aussi être envisagée pour contourner les mécanismes d'accommodation aux insecticides qui ciblent les nAChRs.

Enfin, nous avons démontré que des dsRNAs qui ciblent la sous-unité nicotinique divergente *Apisumβ2* du puceron ne présentent pas de toxicité aigüe sur l'abeille *Apis mellifera*, un insecte bénéfique indispensable au maintien d'un écosystème varié. Ces résultats permettent de suggérer la spécificité de ces agents de biocontrôle. Ainsi, les dsRNAs dirigés contre les acteurs du système cholinergique semblent être de nouveaux outils de choix pour la mise en place de nouvelles stratégies de lutte contre les insectes ravageurs et de gestion des mécanismes d'accommodation aux insecticides.

2. Quelles sont les autres cibles potentielles de l'interférence ARN au sein du système cholinergique de l'insecte ?

Les premiers travaux sur l'acétylcholine et le système cholinergique remontent à plus d'un siècle (Bertrand et Wallace, 2020). L'implication du système cholinergique dans de nombreuses fonctions biologiques en fait un système primordial dans la physiologie du système nerveux central de l'insecte. Malgré tout, le système cholinergique de l'insecte reste encore moins étudié que celui des vertébrés. En effet, la composition des nAChRs, la fonction de certaines protéines ou encore la manière dont tous les acteurs du système cholinergique interagissent et fonctionnent de façon coordonnée restent à ce jour méconnues. En ce sens, les cibles potentielles de la technique d'ARNi au sein du système cholinergique permettant de le perturber et/ou d'engendrer la mort de l'insecte pourraient être multiples.

2.1. Les autres sous-unités nicotiques de l'insecte

2.1.1. Pharmacologie et composition en sous-unités nicotiques des nAChRs d'insecte

Jusqu'ici, l'utilisation de la technique d'ARNi dirigés contre une sous-unité nicotinique a uniquement été associée à la diminution de la sensibilité d'un insecte à un insecticide. Par exemple, les blattes *Periplaneta americana* traitées avec des dsRNAs ciblant la sous-unité *Pamea2* (Bantz *et al.*, 2022), les doryphores *Leptinotarsa decemlineata* avec des dsRNAs ciblant la sous-unité *Lda1* (Qu *et al.*, 2016) ou les cicadelles brunes *Nilaparvata lugens* avec des dsRNAs ciblant la sous-unité *Nla8* (Zhang *et al.*, 2015b) présentent une diminution significative de leur mortalité après une exposition à l'IMI comparés respectivement à des blattes, doryphores ou cicadelles contrôles. A partir de ces études, on peut suggérer l'existence d'un remaniement de la composition en sous-unités nicotiques des nAChRs de ces insectes après un traitement avec des ARNs interférents. En effet, comme il a pu être discuté en introduction de ce manuscrit, la pharmacologie des nAChRs d'insectes, et par extension leur sensibilité aux insecticides, sont influencées par leur composition en sous-unités nicotiques (Raymond *et al.*, 2017). En ce sens, on peut supposer qu'il existe des sous-unités nicotiques chez l'insecte pour lesquelles la diminution d'expression par l'ARNi pourrait engendrer des modifications de la composition en sous-unités nicotiques des nAChRs exprimés à la membrane et par conséquent pourrait conduire également à une augmentation de leur sensibilité à un insecticide. Cependant, il est encore impossible de relier la composition en sous-unités nicotiques d'un nAChR natif d'insecte à un profil pharmacologique. L'expression de nAChRs d'insecte en système hétérologue associée à une approche électrophysiologique permet de relier une composition en sous-unités nicotiques d'un récepteur à un profil

pharmacologique. De cette manière, il a pu être suggéré que, chez la mouche *Drosophila melanogaster*, les sous-unités Da1 et Da2 diminueraient l'affinité des nAChRs aux néonicotinoïdes alors que Da3 aurait l'effet inverse (Komori *et al.*, 2023). Cependant, bien que les nAChRs recombinés soient fonctionnels, il est impossible de s'assurer que leur combinaison en sous-unités nicotiniques corresponde à celle d'un récepteur natif et que le nombre de nAChRs recombinés et exprimés à la membrane ne diffère pas par rapport aux neurones d'insectes. Dans ce contexte, d'autres approches complémentaires peuvent être envisagées. Une étude réalisée chez l'abeille *Apis mellifera* a permis d'associer un profil pharmacologique d'une population de nAChRs à un profil d'expression de sous-unités nicotiniques en combinant des approches électrophysiologique et de RT-PCR sur cellule unique (Dupuis *et al.*, 2011). Dans l'objectif de déterminer les sous-unités nicotiniques qu'il serait pertinent de cibler avec des dsRNAs, ce type d'approche appliqué aux insectes ravageurs aurait plusieurs avantages. En effet, il serait alors possible de déterminer les sous-unités nicotiniques impliquées dans la formation de sous-types de nAChRs sensibles ou insensibles à un insecticide mais également d'évaluer, à l'échelle du neurone, l'impact d'un traitement aux dsRNAs sur la réponse des récepteurs à un insecticide tout en validant quantitativement l'effet de ces derniers sur l'expression de la sous-unité nicotinique cible.

2.1.2. Les autres sous-unités nicotiniques divergentes

Dans ce travail, nous avons démontré que l'utilisation de dsRNAs qui ciblent la sous-unité nicotinique divergente Apisum β 2 permet de contrôler les populations de puceron *Acyrtosiphon pisum* aux stades larvaire et adulte suggérant l'importance de cette sous-unité divergente pour la survie du puceron. De façon générale, il est encore difficile d'assigner une fonction précise aux sous-unités nicotiniques divergentes d'insecte (Jones et Sattelle, 2010). Il serait intéressant de déterminer, par la technique d'ARNi, si la sous-unité Apisum β 2 est un cas particulier ou si les autres sous-unités nicotiniques divergentes, Apisuma9 et Apisuma10 (Dale *et al.*, 2010), sont tout aussi importantes pour la survie de ce puceron. De plus, à partir des diverses études qui ont permis l'identification des familles de gènes des sous-unités nicotiniques de l'insecte, il a pu être supposé que chaque espèce d'insecte possède au moins une sous-unité nicotinique divergente (Jones et Sattelle, 2010). Par exemple, le moustique *Anopheles gambiae*, un insecte vecteur du paludisme, possède une sous-unité divergente, Agama9 (Jones *et al.*, 2005), et le criquet *Locusta migratoria*, un important ravageur de culture, en présente trois qui sont Loca9, Loc β 2 et Loc β 3 (Wang *et al.*, 2015; Bao *et al.*, 2017). Ainsi, évaluer l'utilisation de la technique d'ARNi dirigée contre ces sous-unités divergentes chez ces espèces est envisageable pour déterminer si cette stratégie est applicable à d'autres insectes nuisibles.

2.1.3. Les sous-unités nicotiniques impliquées dans les phénomènes de résistance aux insecticides

Pour la première fois, nous avons démontré que l'utilisation de la technique d'ARNi dirigée contre une sous-unité nicotinique permet le retour d'un insecte accommodé à un insecticide, à un phénotype sensible. En effet, les blattes *Periplaneta americana* accommodées à l'IMI et qui ont ingéré des dsRNAs qui ciblent la sous-unité nicotinique Pame β 1 présentent une mortalité après une intoxication aiguë à cet insecticide similaire au contrôle. Cependant, dans ce travail, nous avons étudié l'utilisation de l'ARNi dirigée contre une sous-unité nicotinique pour contourner les mécanismes d'accommodation et non pas les mécanismes de résistance aux

insecticides. L'analyse du profil d'expression des sous-unités nicotiques d'une souche de moucheron *Bradysia odoriphaga* résistante à l'IMI a démontré que les sous-unités nicotiques *Boa3* et *Boa8* sont surexprimées par rapport à la souche de référence (Shan *et al.*, 2020). En ce sens, il serait intéressant de cibler l'une de ces sous-unités avec des dsRNAs et d'évaluer leur impact sur la sensibilité à l'IMI de ces insectes résistants. De plus, il a été rapporté que l'utilisation de la technique d'ARNi dirigée contre une séquence consensus des gènes *CYP4* a permis de restaurer la sensibilité à l'IMI d'une souche de psylle asiatique *Diaphorina citri* résistante à cet insecticide (Killiny *et al.*, 2014). Comme il a été discuté en introduction de ce manuscrit, les phénomènes de résistances aux insecticides résultent souvent de plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires distincts tels que la surexpression de certaines enzymes de détoxification et la modification des protéines cibles des insecticides. Ainsi, il peut être envisagé de combiner l'utilisation de dsRNAs qui ciblent une enzyme de détoxification et une sous-unité nicotinique. Cependant, la sélection des cibles doit se faire en se basant sur l'identification des acteurs clés dans ces mécanismes de résistances qui peuvent différer selon les cas.

2.1.4. Implication des phénomènes de compensation en réponse à un ARN interférent

Le système cholinergique de l'insecte est complexe et les mécanismes permettant sa régulation ne sont pas entièrement élucidés. Il a pu être décrit à plusieurs reprises que suite à l'application d'un ARN interférent qui cible une sous-unité nicotinique, des modifications de l'expression d'autres sous-unités nicotiques interviennent pour ainsi compenser la diminution d'expression de la sous-unité cible. En effet, un tel phénomène de compensation a pu être observé chez le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* traité avec un dsRNA ciblant la sous-unité *Lda1* (Qu *et al.*, 2016) ou encore la mouche *Drosophila melanogaster* traitée avec des dsRNAs qui ciblent les sous-unités *Da1*, *Da2* ou *Da3* (Komori *et al.*, 2023). Dans ce travail de thèse, nous avons démontré que l'application topique de dsRNAs qui ciblent la sous-unité *Apisumβ2* induit des modifications d'expression des sous-unités *Apisuma1-4* et *Apisuma6-8* du puceron *Acyrtosiphon pisum*, suggérant également l'apparition d'un phénomène de compensation. En particulier, les sous-unités *Apisuma1* et *Apisuma7* sont vingt fois plus exprimées dans ce cas. Ainsi, il pourrait être envisagé de combiner l'utilisation des dsRNAs qui ciblent la sous-unité *Apisumβ2* avec des dsRNAs dirigés contre la sous-unité *Apisuma1* ou *Apisuma7* pour contrôler les populations de puceron *Acyrtosiphon pisum*.

Enfin, l'analyse de l'expression des sous-unités nicotiques et de protéines auxiliaires a démontré des variations de l'expression de ces gènes chez des moustiques *Anopheles gambiae* issus d'une souche résistante aux insecticides organophosphorés et carbamates (*AcerKis*), qui ciblent l'AChE, par rapport à la souche de référence *Kisumu* (données non-publiées du laboratoire SiFCIR). Ainsi, ces résultats suggèrent une régulation à l'échelle du système cholinergique. A l'heure actuelle, les mécanismes de compensation en réponse à un ARN interférent qui cible une sous-unité nicotinique ont uniquement été caractérisés au niveau des nAChRs et des sous-unités qui les composent mais pas sur l'ensemble des éléments impliqués dans le système cholinergique. En ce sens, il serait intéressant de les étudier à l'échelle du système cholinergique. Par exemple, on peut envisager d'évaluer l'impact du traitement avec les dsRNAs qui ciblent la sous-unité *Apisumβ2* sur les AChEs du puceron *Acyrtosiphon pisum*. De la même manière, comme les nAChRs sont notamment régulés par des protéines auxiliaires, il serait intéressant d'évaluer l'impact de ces dsRNAs sur l'expression de ces protéines.

Dans ce cas, l'utilisation combinée de dsRNAs qui ciblent différents acteurs du système cholinergique pourrait être envisagée pour lutter contre les insectes ravageurs.

2.2. Les protéines auxiliaires

La régulation des nAChRs d'insectes fait intervenir divers mécanismes tels que des voies de signalisation intracellulaire ou des protéines auxiliaires. Ces protéines auxiliaires ont un intérêt particulier dans l'expression en système hétérologue de nAChRs recombinés de mammifères et d'insectes (Jones *et al.*, 2010). Chez les insectes, les protéines auxiliaires RIC-3 (Lansdell *et al.*, 2012; Takayama *et al.*, 2022), NACHO (Hawkins *et al.*, 2022), UNC-50 (Takayama *et al.*, 2022) et TMX3 (Ihara *et al.*, 2020; Takayama *et al.*, 2022; Komori *et al.*, 2023) ont pu être identifiées et sont utilisées pour permettre ou faciliter l'expression en système hétérologue de nAChRs recombinés fonctionnels. En ce sens, on peut suggérer que, de la même façon que dans ces systèmes d'expression, ces différentes protéines joueraient un rôle prépondérant dans le fonctionnement des nAChRs et par extension dans le système cholinergique de l'insecte. Ainsi, ces protéines pourraient être des cibles de choix de l'ARNi pour perturber le système cholinergique et induire la mort des insectes cibles. Au laboratoire, des analyses bioinformatiques comparatives ont permis de prédire des séquences nucléotidiques qui correspondent à des protéines auxiliaires chez le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. En effet, trois isoformes de RIC-3, cinq isoformes de Lynx, une UNC-50 et une NACHO ont pu être identifiées. Leurs séquences ont été validées et leur niveau d'expression au sein du puceron a pu être évalué par qPCR (données non-publiées du laboratoire SiFCIR). Ces résultats pourraient permettre par la suite de sélectionner les protéines auxiliaires qu'il serait pertinent de cibler par ARNi.

3. Comment augmenter l'efficacité des dsRNAs chez l'insecte pour la mise en place d'un produit formulé ?

L'objectif de ce travail de thèse était de valider l'utilisation des ARNs interférents dirigés contre les acteurs du système cholinergique pour lutter contre les insectes ravageurs. Malgré tout, il est important de rationaliser l'utilisation de nouvelles stratégies de lutte. En effet, l'utilisation massive et non-raisonnée des insecticides a conduit à des effets délétères sur des organismes non-cibles ainsi qu'à des modifications physiologiques, cellulaires et moléculaires des insectes cibles induisant une diminution globale de leur efficacité. En ce sens, la réflexion quant aux doses de nouveaux agents de contrôle répandus en champs, tels que des dsRNAs, est importante dans l'élaboration de stratégies de lutte innovantes. En réponse à cette problématique, de nouvelles méthodes qui permettent de favoriser l'efficacité des dsRNAs et qui n'impliquent pas d'augmentation des doses sont de plus en plus étudiées. En introduction de ce manuscrit, les stratégies d'encapsulation des dsRNAs dans des nanoparticules comme des liposomes cationiques ou encore des polymères pour augmenter leur efficacité ont été présentées. Dans ce travail, les dsRNAs ont été encapsulés dans des liposomes cationiques. En effet, une étude précédemment réalisée chez la blatte *Blattella germanica* a démontré que cette encapsulation au sein d'un liposome cationique permettait de prévenir la dégradation des dsRNAs par des endonucléases présentes dans le tractus digestif de l'insecte (Lin *et al.*, 2017). De plus, une

étude réalisée chez la pyrale *Chilo suppressalis* a permis de comparer l'efficacité de dsRNAs qui ciblent la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) encapsulés dans trois différentes nanoparticules (Wang *et al.*, 2020). Ces trois nanoparticules sont un liposome cationique (Lipofectamine2000), un polymère de chitosane et une nanoparticule carbonnée (« Carbon Quantum Dots » ou CQD). Les auteurs ont démontré, par qPCR et par des tests toxicologiques, que l'ingestion de dsRNAs induisait environ la même diminution d'expression du gène cible dans l'organisme entier et le même taux de mortalité quelque soit la nanoparticule utilisée alors que les dsRNAs non-encapsulés ne présentent aucun effet significatif (Wang *et al.*, 2020). En revanche, la diminution de l'expression du gène cible dans les tissus, autres que ceux du système digestif, après l'ingestion des dsRNAs encapsulés dans la nanoparticule de carbone CQD est plus importante comparée aux deux autres nanoparticules suggérant ainsi que ces nanoparticules carbonnées faciliteraient la systématisation de la réponse d'ARNi chez cet insecte (Wang *et al.*, 2020). Il serait intéressant de déterminer si ces résultats s'appliquent à d'autres espèces d'insectes et plus particulièrement dans quels types de nanoparticules il serait le plus pertinent d'encapsuler les dsRNAs pour favoriser leur efficacité chez le puceron *Acyrtosiphon pisum* ou la blatte *Periplaneta americana*. Enfin, des travaux se sont intéressés à l'utilisation de virus de plantes ou d'insectes pour délivrer les dsRNAs de façon efficace chez les insectes (Gu *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2013; Wuriyanghan et Falk, 2013; Kontogiannatos *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2016; Taning *et al.*, 2018). Plus récemment, l'utilisation de particules pseudo-virales (ou VLP pour « Virus-like particle ») a pu être envisagée pour délivrer des ARNs interférents aux insectes (Xue *et al.*, 2023) mais à ce jour, aucune étude n'a encore rapporté leur utilisation dans ce contexte. De plus, l'utilisation des VLPs comme agents synergisants d'insecticide a pu être envisagée et discutée (Deshayes *et al.*, 2022). En effet, les VLPs peuvent induire une élévation du calcium intracellulaire (Deshayes *et al.*, 2022) comme la majorité des agents synergisants « classiques » (Deshayes *et al.*, 2018). Il a été montré que l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, dans une certaine mesure, pouvait augmenter la sensibilité des protéines cibles aux insecticides (Apaire-Marchais *et al.*, 2016; Deshayes *et al.*, 2018). En particulier, les nAChRs d'insectes présentent notamment de nombreux sites de phosphorylation sur lesquels peuvent survenir des phosphorylations ou déphosphorylations par des voies de signalisation intracellulaires dépendantes du calcium et ainsi moduler leur sensibilité aux néonicotinoïdes (Thany *et al.*, 2007; Raymond *et al.*, 2017). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'utilisation combinée des dsRNAs qui ciblent une sous-unité nicotinique, comme Apisum β 2 du puceron *Acyrtosphion pisum*, encapsulés dans des VLPs et d'un insecticide néonicotinoïde pour synergiser les effets de ces molécules.

Pour conclure, l'ARNi présente aujourd'hui un grand intérêt dans la lutte contre les insectes ravageurs de cultures. En particulier, cibler le système cholinergique de l'insecte par cette technique semble être une nouvelle stratégie de lutte importante qui doit être considérée. La mise en place de nouvelles méthodes visant à favoriser les effets de l'ARNi tout en limitant les doses appliquées en champs est une étape indispensable pour la mise au point de produits formulés qui contiennent ces agents de contrôle. De façon générale, développer des systèmes de productions agricoles durables en limitant les doses d'agents de contrôle répandus en champs est aujourd'hui d'une grande importance. Pour ce faire, protéger les cultures contre les insectes ravageurs tout en limitant l'impact des outils de lutte classique comme les insecticides sur les écosystèmes par la technique d'ARNi pourrait être une avancée majeure en agriculture contemporaine.

Bibliographie

- A -

- Abbott, W. S.** (1925). A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *J Econ Entomol* **18**, 265–267.
- Abd El Halim, H. M., Alshukri, B. M. H., Ahmad, M. S., Nakasu, E. Y. T., Awwad, M. H., Salama, E. M., Gatehouse, A. M. R. et Edwards, M. G.** (2016). RNAi-mediated knockdown of the voltage gated sodium ion channel TcNav causes mortality in *Tribolium castaneum*. *Sci Rep* **6**, 29301.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., et al.** (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185–2195.
- Adedara, I. A., Mohammed, K. A., Da-Silva, O. F., Salaudeen, F. A., Gonçalves, F. L. S., Rosemberg, D. B., Aschner, M., Rocha, J. B. T. et Farombi, E. O.** (2022). Utility of cockroach as a model organism in the assessment of toxicological impacts of environmental pollutants. *Environmental Advances* **8**, 100195.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K. et Mukherjee, S. K.** (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 657–685.
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M. et Rogers, S. W.** (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* **89**, 73–120.
- Aleman-Meza, B., Loeza-Cabrera, M., Peña-Ramos, O., Stern, M. et Zhong, W.** (2017). High-content behavioral profiling reveals neuronal genetic network modulating *Drosophila* larval locomotor program. *BMC Genetics* **18**, 40.
- Aliouane, Y., el Hassani, A. K., Gary, V., Armengaud, C., Lambin, M. et Gauthier, M.** (2009). Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: Effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**, 113–122.
- Alon, M., Alon, F., Nauen, R. et Morin, S.** (2008). Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**, 940–949.
- Alptekin, S., Bass, C., Nicholls, C., Paine, M. J. I., Clark, S. J., Field, L. et Moores, G. D.** (2016). Induced thiacloprid insensitivity in honeybees (*Apis mellifera* L.) is associated with up-regulation of detoxification genes. *Insect Molecular Biology* **25**, 171–180.
- Apaire-Marchais, V., Ogliastro, M., Chandre, F., Pennetier, C., Raymond, V. et Lapied, B.** (2016). Virus and calcium: an unexpected tandem to optimize insecticide efficacy. *Environmental Microbiology Reports* **8**, 168–178.

Araud, T., Graw, S., Berger, R., Lee, M., Neveu, E., Bertrand, D. et Leonard, S. (2011). The chimeric gene *CHRFAM7A*, a partial duplication of the *CHRNA7* gene, is a dominant negative regulator of $\alpha 7$ nAChR function. *Biochemical Pharmacology* **82**, 904–914.

Arora, A. K., Chung, S. H. et Douglas, A. E. (2021). Non-Target Effects of dsRNA Molecules in Hemipteran Insects. *Genes* **12**, 407.

Aygun, D., Doganay, Z., Altintop, L., Guven, H., Onar, M., Deniz, T. et Sunter, T. (2002). Serum Acetylcholinesterase and Prognosis of Acute Organophosphate Poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* **40**, 903–910.

- B -

Badiou, A., Brunet, J.-L. et Belzunces, L. P. (2007). Existence of two membrane-bound acetylcholinesterases in the honey bee head. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **66**, 122–134.

Baek, J. H., Kim, J. I., Lee, D.-W., Chung, B. K., Miyata, T. et Lee, S. H. (2005). Identification and characterization of ace1-type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **81**, 164–175.

Bai, D., Lummis, S. C. R., Leicht, W., Breer, H. et Sattelle, D. B. (1991). Actions of imidacloprid and a related nitromethylene on cholinergic receptors of an identified insect motor neurone. *Pesticide Science* **33**, 197–204.

Balabanidou, V., Grigoraki, L. et Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Curr Opin Insect Sci* **27**, 68–74.

Balabanidou, V., Kefi, M., Aivaliotis, M., Koidou, V., Girotti, J. R., Mijailovsky, S. J., Juárez, M. P., Papadogiorgaki, E., Chalepakis, G., Kampouraki, A., et al. (2019). Mosquitoes cloak their legs to resist insecticides. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**, 20191091.

Bantz, A. (2020). Une exposition subchronique à une dose sublétales d'Imidaclopride peut-elle entraîner une modification des récepteurs nicotiques chez la blatte *Periplaneta americana* ?

Bantz, A., Camon, J., Froger, J.-A., Goven, D. et Raymond, V. (2018). Exposure to sublethal doses of insecticide and their effects on insects at cellular and physiological levels. *Curr Opin Insect Sci* **30**, 73–78.

Bantz, A., Goven, D., Siegwart, M., Maugin, S. et Raymond, V. (2022). Exposure to a sublethal dose of imidacloprid induces cellular and physiological changes in *Periplaneta americana*: Involvement of $\alpha 2$ nicotinic acetylcholine subunit in imidacloprid sensitivity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **181**, 105014.

Bao, W. X., Narai, Y., Nakano, A., Kaneda, T., Murai, T. et Sonoda, S. (2014). Spinosad resistance of melon thrips, *Thrips palmi*, is conferred by G275E mutation in $\alpha 6$ subunit of nicotinic acetylcholine receptor and cytochrome P450 detoxification. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **112**, 51–55.

Bao, W., Cao, B., Zhang, Y. et Wuriyanghan, H. (2016). Silencing of *Mythimna separata* chitinase genes via oral delivery of in planta-expressed RNAi effectors from a recombinant plant virus. *Biotechnol Lett* **38**, 1961–1966.

Bao, H., Liu, Y., Zhang, Y. et Liu, Z. (2017). Two distinctive β subunits are separately involved in two binding sites of imidacloprid with different affinities in *Locusta migratoria* manilensis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **140**, 36–41.

- Bao, H., Xu, X., Liu, W., Yu, N. et Liu, Z.** (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**, 24–30.
- Barbara, G. S., Zube, C., Rybak, J., Gauthier, M. et Grünewald, B.** (2005). Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A* **191**, 823–836.
- Barbara, G. S., Grünewald, B., Paute, S., Gauthier, M. et Raymond-Delpech, V.** (2008). Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains. *Invert Neurosci* **8**, 19–29.
- Bar-Even, A., Noor, E., Savir, Y., Liebermeister, W., Davidi, D., Tawfik, D. S. et Milo, R.** (2011). The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters. *Biochemistry* **50**, 4402–4410.
- Bass, C., Puinean, A. M., Zimmer, C. T., Denholm, I., Field, L. M., Foster, S. P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R. et Williamson, M. S.** (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **51**, 41–51.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S. et Nauen, R.** (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **121**, 78–87.
- Baum, J. A. et Roberts, J. K.** *Progress Towards RNAi-Mediated Insect Pest Management*.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., Johnson, S., Plaetinck, G., Munyikwa, T., Pleau, M., et al.** (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol* **25**, 1322–1326.
- Ben-Amar, A., Daldoul, S., Reustle, G. M., Krczal, G. et Mliki, A.** (2016). Reverse Genetics and High Throughput Sequencing Methodologies for Plant Functional Genomics. *Curr Genomics* **17**, 460–475.
- Bentley, G. N., Jones, A. K., Oliveros Parra, W. G. et Agnew, A.** (2004). ShAR1 α and ShAR1 β : novel putative nicotinic acetylcholine receptor subunits from the platyhelminth blood fluke *Schistosoma*. *Gene* **329**, 27–38.
- Benzidane, Y., Goven, D., Abd-Ella, A. A., Deshayes, C., Lapied, B. et Raymond, V.** (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**, 239–247.
- Bertrand, D. et Gopalakrishnan, M.** (2007). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* **74**, 1155–1163.
- Bertrand, D. et Wallace, T. L.** (2020). A Review of the Cholinergic System and Therapeutic Approaches to Treat Brain Disorders. In *Behavioral Pharmacology of the Cholinergic System* (ed. Shoaib, M.) and Wallace, T. L.), pp. 1–28. Cham: Springer International Publishing.
- Bertrand, D., Galzi, J. L., Devillers-Thiéry, A., Bertrand, S. et Changeux, J. P.** (1993). Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 6971–6975.
- Bigbee, J. W. et Sharma, K. V.** (2004). The Adhesive Role of Acetylcholinesterase (AChE): Detection of AChE Binding Proteins in Developing Rat Spinal Cord. *Neurochem Res* **29**, 2043–2050.
- Biryukova, I. et Ye, T.** (2015). Endogenous siRNAs and piRNAs derived from transposable elements and genes in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *BMC Genomics* **16**, 278.
- Blackman, R. L. et Eastop, V. F.** (2017). Taxonomic issues. *Aphids as crop pests* 1–36.

- Bodereau-Dubois, B., List, O., Calas-List, D., Marques, O., Communal, P.-Y., Thany, S. H. et Lapied, B.** (2012). Transmembrane Potential Polarization, Calcium Influx, and Receptor Conformational State Modulate the Sensitivity of the Imidacloprid-Insensitive Neuronal Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor to Neonicotinoid Insecticides. *J Pharmacol Exp Ther* **341**, 326–339.
- Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., Ilagan, O., Lawrence, C., Levine, S., Moar, W., et al.** (2012). Characterizing the Mechanism of Action of Double-Stranded RNA Activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLOS ONE* **7**, e47534.
- Bona, A. C. D., Chitolina, R. F., Fermino, M. L., de Castro Poncio, L., Weiss, A., Lima, J. B. P., Paldi, N., Bernardes, E. S., Henen, J. et Maori, E.** (2016). Larval application of sodium channel homologous dsRNA restores pyrethroid insecticide susceptibility in a resistant adult mosquito population. *Parasites & Vectors* **9**, 397.
- Bourne, Y., Taylor, P. et Marchot, P.** (1995). Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: Crystal structure of the complex. *Cell* **83**, 503–512.
- Bourne, Y., Radić, Z., Sulzenbacher, G., Kim, E., Taylor, P. et Marchot, P.** (2006). Substrate and Product Trafficking through the Active Center Gorge of Acetylcholinesterase Analyzed by Crystallography and Equilibrium Binding. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 29256–29267.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Bräunig, P. et Pflüger, H.-J.** (2001). The unpaired median neurons of insects. In *Advances in Insect Physiology*, pp. 185-IN2. Academic Press.
- Breer, H. et Sattelle, D. B.** (1987). Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors. *Journal of Insect Physiology* **33**, 771–790.
- Brejč, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van der Oost, J., Smit, A. B. et Sixma, T. K.** (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* **411**, 269–276.
- Brevik, K., Lindström, L., McKay, S. D. et Chen, Y. H.** (2018). Transgenerational effects of insecticides—implications for rapid pest evolution in agroecosystems. *Current Opinion in Insect Science* **26**, 34–40.
- Buckingham, S. D., Balk, M. I., Lummis, S. C. R., Jewess, P. et Sattelle, D. B.** (1995). Actions of nitromethylenes on an α -Bungarotoxin-sensitive neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* **34**, 591–597.
- Buckingham, S., Lapied, B., Corronc, H. et Sattelle, F.** (1997). Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *Journal of Experimental Biology* **200**, 2685–2692.

- C -

- Cagliari, D., Dias, N. P., Galdeano, D. M., dos Santos, E. Á., Smagghe, G. et Zotti, M. J.** (2019). Management of Pest Insects and Plant Diseases by Non-Transformative RNAi. *Front. Plant Sci.* **10**, 1319.
- Camargo, C., Wu, K., Fishilevich, E., Narva, K. E. et Siegfried, B. D.** (2018). Knockdown of RNA interference pathway genes in western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*, identifies no fitness costs associated with Argonaute 2 or Dicer-2. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **148**, 103–110.

- Campoy, F. J., Vidal, C. J., Muñoz-Delgado, E., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J. et Nieto-Cerón, S.** (2016). Cholinergic system and cell proliferation. *Chemico-Biological Interactions* **259**, 257–265.
- Cappelle, K., de Oliveira, C. F. R., Van Eynde, B., Christiaens, O. et Smaghe, G.** (2016). The involvement of clathrin-mediated endocytosis and two Sid-1-like transmembrane proteins in double-stranded RNA uptake in the Colorado potato beetle midgut. *Insect Molecular Biology* **25**, 315–323.
- Cartaud, J., Benedetti, E. L., Cohen, J. B., Meunier, J.-C. et Changeux, J.-P.** (1973). Presence of a lattice structure in membrane fragments rich in nicotinic receptor protein from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *FEBS Letters* **33**, 109–113.
- Cartereau, A., Taillebois, E., Selvam, B., Martin, C., Graton, J., Le Questel, J.-Y. et Thany, S. H.** (2020). Cloning and Expression of Cockroach $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit. *Frontiers in Physiology* **11**,.
- Cartereau, A., Taillebois, E., Le Questel, J.-Y. et Thany, S. H.** (2021). Mode of Action of Neonicotinoid Insecticides Imidacloprid and Thiacloprid to the Cockroach Pamea7 Nicotinic Acetylcholine Receptor. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 9880.
- Cartereau, A., Pineau, X., Lebreton, J., Mathé-Allainmat, M., Taillebois, E. et Thany, S. H.** (2022). Impairments in learning and memory performances associated with nicotinic receptor expression in the honeybee *Apis mellifera* after exposure to a sublethal dose of sulfoxaflor. *PLOS ONE* **17**, e0272514.
- Carthew, R. W. et Sontheimer, E. J.** (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642–655.
- Casida, J. E.** (2018). Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators: Progress and Prospects. *Annu. Rev. Entomol.* **63**, 125–144.
- Casida, J. E. et Durkin, K. A.** (2013a). Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annu. Rev. Entomol.* **58**, 99–117.
- Casida, J. E. et Durkin, K. A.** (2013b). Anticholinesterase insecticide retrospective. *Chemico-Biological Interactions* **203**, 221–225.
- Castellanos, N. L., Smaghe, G., Sharma, R., Oliveira, E. E. et Christiaens, O.** (2019). Liposome encapsulation and EDTA formulation of dsRNA targeting essential genes increase oral RNAi-caused mortality in the Neotropical stink bug *Euschistus heros*. *Pest Management Science* **75**, 537–548.
- Celie, P. H. N., van Rossum-Fikkert, S. E., van Dijk, W. J., Brejc, K., Smit, A. B. et Sixma, T. K.** (2004). Nicotine and Carbamylcholine Binding to Nicotinic Acetylcholine Receptors as Studied in AChBP Crystal Structures. *Neuron* **41**, 907–914.
- Cha, D. J. et Lee, S. H.** (2015). Evolutionary origin and status of two insect acetylcholinesterases and their structural conservation and differentiation. *Evolution & Development* **17**, 109–119.
- Chamaon, K., Smalla, K.-H., Thomas, U. et Gundelfinger, E. 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**, 149–157.
- Chambers, C., Cutler, P., Huang, Y.-H., Goodchild, J. A., Blythe, J., Wang, C. K., Bigot, A., Kaas, Q., Craik, D. J., Sabbadin, D., et al.** (2019). Insecticidal spider toxins are high affinity positive allosteric modulators of the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Letters* **593**, 1336–1350.
- Chandre, F., Darriet, F., Darder, M., Cuany, A., Doannio, J. M. C., Pasteur, N. et Guillet, P.** (1998). Pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* from West Africa. *Medical and Veterinary Entomology* **12**, 359–366.
- Changeux, J.-P., Kasai, M. et Lee, C.-Y.** (1970). Use of a Snake Venom Toxin to Characterize the Cholinergic Receptor Protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **67**, 1241–1247.

- Chareonviriyaphap, T., Bangs, M. J., Suwonkerd, W., Kongmee, M., Corbel, V. et Ngoen-Klan, R.** (2013). Review of insecticide resistance and behavioral avoidance of vectors of human diseases in Thailand. *Parasites & Vectors* **6**, 280.
- Chatonnet, A. et Lockridge, O.** (1989). Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal* **260**, 625–634.
- Chatzidaki, A. et Millar, N. S.** (2015). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* **97**, 408–417.
- Chejanovsky, N., Ophir, R., Schwager, M. S., Slabezki, Y., Grossman, S. et Cox-Foster, D.** (2014). Characterization of viral siRNA populations in honey bee colony collapse disorder. *Virology* **454–455**, 176–183.
- Chen, M. et Han, Z.** (2006). Cloning and sequence analysis of 2 different acetylcholinesterase genes in *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*. *Genome* **49**, 239–243.
- Chen, H.-J., Liao, Z., Hui, X.-M., Li, G.-Q., Li, F. et Han, Z.-J.** (2009). Ace2, rather than ace1, is the major acetylcholinesterase in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Science* **16**, 297–303.
- Chen, X., Li, F., Chen, A., Ma, K., Liang, P., Liu, Y., Song, D. et Gao, X.** (2017). Both point mutations and low expression levels of the nicotinic acetylcholine receptor β 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**, 1–8.
- Cheung, J., Mahmood, A., Kalathur, R., Liu, L. et Carlier, P. R.** (2018). Structure of the G119S Mutant Acetylcholinesterase of the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Reveals Basis of Insecticide Resistance. *Structure* **26**, 130-136.e2.
- Chintapalli, V. R., Wang, J. et Dow, J. A. T.** (2007). Using FlyAtlas to identify better *Drosophila melanogaster* models of human disease. *Nat Genet* **39**, 715–720.
- Choi, M.-Y. et Vander Meer, R. K.** (2019). Phenotypic Effects of PBAN RNAi Using Oral Delivery of dsRNA to Corn Earworm (Lepidoptera: Noctuidae) and Tobacco Budworm Larvae. *Journal of Economic Entomology* **112**, 434–439.
- Christen, V., Mittner, F. et Fent, K.** (2016). Molecular Effects of Neonicotinoids in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Technol.* **50**, 4071–4081.
- Christiaens, O. et Smagghe, G.** (2014). The challenge of RNAi-mediated control of hemipterans. *Current Opinion in Insect Science* **6**, 15–21.
- Christiaens, O., Swevers, L. et Smagghe, G.** (2014). DsRNA degradation in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) associated with lack of response in RNAi feeding and injection assay. *Peptides* **53**, 307–314.
- Christiaens, O., Tardajos, M. G., Martinez Reyna, Z. L., Dash, M., Dubruel, P. et Smagghe, G.** (2018). Increased RNAi Efficacy in *Spodoptera exigua* via the Formulation of dsRNA With Guanylated Polymers. *Frontiers in Physiology* **9**,.
- Christiaens, O., Whyard, S., Vélez, A. M. et Smagghe, G.** (2020). Double-Stranded RNA Technology to Control Insect Pests: Current Status and Challenges. *Frontiers in Plant Science* **11**,.
- CNEV (Centre national d'Expertise sur les Vecteurs)** (2014). Utilisation des insecticides et gestion de la résistance.
- Collet, C. et Raymond, V.** (2022). Modes d'action neurotoxiques, cardiotoxiques et myotoxiques des insecticides chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. In *Les abeilles face au risque toxique*, pp. 157–198. CNRS Editions.

- Colletier, J.-P., Fournier, D., Greenblatt, H. M., Stojan, J., Sussman, J. L., Zaccai, G., Silman, I. et Weik, M.** (2006). Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *The EMBO Journal* **25**, 2746–2756.
- Combes, D., Fedon, Y., Grauso, M., Toutant, J.-P. et Arpagaus, M.** (2000). Four Genes Encode Acetylcholinesterases in the Nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. cDNA Sequences, Genomic Structures, Mutations and in vivo Expression. *Journal of Molecular Biology* **300**, 727–742.
- Combes, D., Fedon, Y., Toutant, J.-P. et Arpagaus, M.** (2001). Acetylcholinesterase genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In *International Review of Cytology*, pp. 207–239. Academic Press.
- Cooper, A. M., Silver, K., Zhang, J., Park, Y. et Zhu, K. Y.** (2019). Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science* **75**, 18–28.
- Cooper, A. M., Song, H., Yu, Z., Biondi, M., Bai, J., Shi, X., Ren, Z., Weerasekara, S. M., Hua, D. H., Silver, K., et al.** (2021). Comparison of strategies for enhancing RNA interference efficiency in *Ostrinia nubilalis*. *Pest Management Science* **77**, 635–645.
- Corringer, P.-J., Novère, N. L. et Changeux, J.-P.** (2000). Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **40**, 431–458.
- Corringer, P.-J., Poitevin, F., Prevost, M. S., Sauguet, L., Delarue, M. et Changeux, J.-P.** (2012). Structure and Pharmacology of Pentameric Receptor Channels: From Bacteria to Brain. *Structure* **20**, 941–956.
- Courjaret, R. et 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). *Mol Pharmacol* **60**, 80–91.
- Courjaret, R., Grolleau, F. et Lapied, B.** (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**, 2023–2034.
- Crossman, A. R., Kerkut, G. A., Pitman, R. M. et Walker, R. J.** (1971). Electrically excitable nerve cell bodies in the central ganglia of two insect species *Periplaneta americana* and *Schistocerca gregaria*. Investigation of cell geometry and morphology by intracellular dye injection. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **40**, 579–594.
- Cutler, G. C. et Guedes, R. N. C.** (2017). Occurrence and Significance of Insecticide-Induced Hormesis in Insects. In *Pesticide Dose: Effects on the Environment and Target and Non-Target Organisms*, pp. 101–119. American Chemical Society.
- Czech, B., Malone, C. D., Zhou, R., Stark, A., Schlingehayde, C., Dus, M., Perrimon, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J. A., Sachidanandam, R., et al.** (2008). An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* **453**, 798–802.

- D -

- Dacher, M., Lagarrigue, A. et Gauthier, M.** (2005). Antennal tactile learning in the honeybee: Effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience* **130**, 37–50.
- Dale, H. H.** (1914). The Action of Certain Esters and Ethers of Choline, and Their Relation to Muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* **6**, 147–190.

- Dale, H. H., Feldberg, W. et Vogt, M.** (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *The Journal of Physiology* **86**, 353–380.
- Dale, R. P., Jones, A. K., Tamborindeguy, C., Davies, T. G. E., Amey, J. S., Williamson, S., Wolstenholme, A., Field, L. M., Williamson, M. S., Walsh, T. K., et al.** (2010). Identification of ion channel genes in the *Acyrtosiphon pisum* genome. *Insect Molecular Biology* **19**, 141–153.
- Dani, J. A.** (2015). Chapter One - Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. In *International Review of Neurobiology* (ed. De Biasi, M.), pp. 3–19. Academic Press.
- Darvesh, S., Hopkins, D. A. et Geula, C.** (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* **4**, 131–138.
- Dau, A., Komal, P., Truong, M., Morris, G., Evans, G. et Nashmi, R.** (2013). RIC-3 differentially modulates $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nicotinic receptor assembly, expression, and nicotine-induced receptor upregulation. *BMC Neuroscience* **14**, 47.
- Dawkar, V. V., Chikate, Y. R., Lomate, P. R., Dholakia, B. B., Gupta, V. S. et Giri, A. P.** (2013). Molecular Insights into Resistance Mechanisms of Lepidopteran Insect Pests against Toxicants. *J. Proteome Res.* **12**, 4727–4737.
- de Almeida, R. B. M., de Almeida Luz, R. L. S., Leite, F. H. A. et Botura, M. B.** (2022). A Review on the In Vitro Evaluation of the Anticholinesterase Activity Based on Ellman's Method. *MRMC* **22**, 1803–1813.
- Dedryver, C.-A., Le Ralec, A. et Fabre, F.** (2010). The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies* **333**, 539–553.
- Defaix, A. et Lapied, B.** (2005). Role of a novel maintained low-voltage-activated inward current permeable to sodium and calcium in pacemaking of insect neurosecretory neurons. *Invert Neurosci* **5**, 135–146.
- Déglise, P., Grünewald, B. et Gauthier, M.** (2002). The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neuroscience Letters* **321**, 13–16.
- Dermauw, W. et Van Leeuwen, T.** (2014). The ABC gene family in arthropods: Comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **45**, 89–110.
- Deshayes, C., Moreau, E., Pitti-Caballero, J., Froger, J.-A., Apaire-Marchais, V. et Lapied, B.** (2018). Synergistic agent and intracellular calcium, a successful partnership in the optimization of insecticide efficacy. *Current Opinion in Insect Science* **30**, 52–58.
- Deshayes, C., Gosselin-Grenet, A.-S., Ogliastro, M., Lapied, B. et Apaire-Marchais, V.** (2022). Can Virus-like Particles Be Used as Synergistic Agent in Pest Management? *Viruses* **14**, 943.
- Desneux, N., Decourtye, A. et Delpuech, J.-M.** (2007). The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology* **52**, 81–106.
- Devillers-Thiery, A., Changeux, J.-P., Paroutaud, P. et Strosberg, A. D.** (1979). The amino-terminal sequence of the 40 000 molecular weight subunit of the acetylcholine receptor protein from *Torpedo marmorata*. *FEBS Letters* **104**, 99–105.
- Devillers-Thiery, A., Giraudat, J., Bentaboulet, M. et Changeux, J. P.** (1983). Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**, 2067–2071.
- Dhandapani, R. K., Gurusamy, D., Howell, J. L. et Palli, S. R.** (2019). Development of CS-TPP-dsRNA nanoparticles to enhance RNAi efficiency in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Sci Rep* **9**, 8775.

- Dhandapani, R. K., Duan, J. J. et Palli, S. R.** (2020). Orally delivered dsRNA induces knockdown of target genes and mortality in the Asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **104**, e21679.
- Dias, N., Cagliari, D., Kremer, F. S., Rickes, L. N., Nava, D. E., Smaghe, G. et Zotti, M.** (2019). The South American Fruit Fly: An Important Pest Insect With RNAi-Sensitive Larval Stages. *Frontiers in Physiology* **10**,.
- Dupuis, J. P., Gauthier, M. et Raymond-Delpech, V.** (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. *Journal of Neurophysiology* **106**, 1604–1613.

- E -

- Eimer, S., Gottschalk, A., Hengartner, M., Horvitz, H. R., Richmond, J., Schafer, W. R. et Bessereau, J.-L.** (2007). Regulation of nicotinic receptor trafficking by the transmembrane Golgi protein UNC-50. *The EMBO Journal* **26**, 4313–4323.
- Ekström, F., Akfur, C., Tunemalm, A.-K. et Lundberg, S.** (2006). Structural Changes of Phenylalanine 338 and Histidine 447 Revealed by the Crystal Structures of Tabun-Inhibited Murine Acetylcholinesterase,. *Biochemistry* **45**, 74–81.
- Elanga-Ndille, E., Nouage, L., Ndo, C., Binyang, A., Assatse, T., Nguiffo-Nguete, D., Djonabaye, D., Irving, H., Tene-Fossog, B. et Wondji, C. S.** (2019). The G119S Acetylcholinesterase (Ace-1) Target Site Mutation Confers Carbamate Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles gambiae* from Cameroon: A Challenge for the Coming IRS Implementation. *Genes* **10**, 790.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W. et Nauen, R.** (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science* **64**, 1099–1105.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. et Featherstone, R. M.** (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* **7**, 88–95.
- El-Shesheny, I., Hajeri, S., El-Hawary, I., Gowda, S. et Killiny, N.** (2013). Silencing Abnormal Wing Disc Gene of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* Disrupts Adult Wing Development and Increases Nymph Mortality. *PLOS ONE* **8**, e65392.
- Elzaki, M. E. A., Zhang, W., Feng, A., Qiou, X., Zhao, W. et Han, Z.** (2016). Constitutive overexpression of cytochrome P450 associated with imidacloprid resistance in *Laodelphax striatellus* (Fallén). *Pest Management Science* **72**, 1051–1058.

- F -

- Faehnle, C. R. et Joshua-Tor, L.** (2010). Argonaute MID domain takes centre stage. *EMBO reports* **11**, 564–565.
- Fayyazuddin, A., Zaheer, M. A., Hiesinger, P. R. et Bellen, H. J.** (2006). The Nicotinic Acetylcholine Receptor $\text{D}\alpha 7$ Is Required for an Escape Behavior in *Drosophila*. *PLOS Biology* **4**, e63.
- Febvay, G., Delobel, B. et Rahbé, Y.** (1988). Influence of the amino acid balance on the improvement of an artificial diet for a biotype of *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae). *Can. J. Zool.* **66**, 2449–2453.

- Feinberg, E. H. et Hunter, C. P.** (2003). Transport of dsRNA into Cells by the Transmembrane Protein SID-1. *Science* **301**, 1545–1547.
- Feng, X., Li, M. et Liu, N.** (2018). Carboxylesterase genes in pyrethroid resistant house flies, *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **92**, 30–39.
- Festucci-Buselli, R. A., Carvalho-Dias, A. S., De Oliveira-Andrade, M., Caixeta-Nunes, C., Li, H.-M., Stuart, J. J., Muir, W., Scharf, M. E. et Pittendrigh, B. R.** (2005). Expression of Cyp6g1 and Cyp12d1 in DDT resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology* **14**, 69–77.
- Ffrench-Constant, R. H. et Roush, R. T.** (1991). Gene mapping and cross-resistance in cyclodiene insecticide-resistant *Drosophila melanogaster* (Mg.). *Genetics Research* **57**, 17–21.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. et Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811.
- Fisher, S. K. et Wonnacott, S.** (2012). Chapter 13 - Acetylcholine. In *Basic Neurochemistry (Eighth Edition)* (ed. Brady, S. T.), Siegel, G. J.), Albers, R. W.), and Price, D. L.), pp. 258–282. New York: Academic Press.
- Flynt, A. S.** (2021). Insecticidal RNA interference, thinking beyond long dsRNA. *Pest Management Science* **77**, 2179–2187.
- Fournier, D., Mutero, A., Pralavorio, M. et Bride, J.-M.** (1993). *Drosophila* acetylcholinesterase: Mechanisms of resistance to organophosphates. *Chemico-Biological Interactions* **87**, 233–238.
- Fox, E. G. P. et Bressan-Nascimento, S.** (2006). Biological characteristics of *Evania appendigaster* (L.) (Hymenoptera: Evaniidae) in different densities of *Periplaneta americana* (L.) *oothecae* (Blattodea: Blattidae). *Biological control: theory and application in pest management*.
- Fujii, T., Sanada-Morimura, S., Oe, T., Ide, M., Van Thanh, D., Van Chien, H., Van Tuong, P., Loc, P. M., Cuong, L. Q., Liu, Z.-W., et al.** (2020). Long-term field insecticide susceptibility data and laboratory experiments reveal evidence for cross resistance to other neonicotinoids in the imidacloprid-resistant brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science* **76**, 480–486.
- Fukuto, T. R.** (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives* **87**, 245–254.

- G -

- Gada, K. D. et Logothetis, D. E.** (2022). PKC regulation of ion channels: The involvement of PIP2. *Journal of Biological Chemistry* **298**, 102035.
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J. A. et Imler, J.-L.** (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in *drosophila*. *Nat Immunol* **7**, 590–597.
- Gauglitz, S. et Pflüger, H.-J.** (2001). Cholinergic transmission via central synapses in the locust nervous system. *J Comp Physiol A* **187**, 825–836.
- Gauthier, M.** (2010). State of the Art on Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor Function in Learning and Memory. In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors* (ed. Thany, S. H.), pp. 97–115. New York, NY: Springer.

- Gauthier, M., Dacher, M., Thany, S. H., Niggebrügge, C., Déglise, P., Kljucovic, P., Armengaud, C. et Grünewald, B.** (2006). Involvement of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory* **86**, 164–174.
- Gautier, H., Auger, J., Legros, C. et Lapied, B.** (2008). Calcium-Activated Potassium Channels in Insect Pacemaker Neurons as Unexpected Target Site for the Novel Fumigant Dimethyl Disulfide. *J Pharmacol Exp Ther* **324**, 149–159.
- Gehle, V. M., Walcott, E. C., Nishizaki, T. et Sumikawa, K.** (1997). N-Glycosylation at the conserved sites ensures the expression of properly folded functional ACh receptors. *Molecular Brain Research* **45**, 219–229.
- Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N. F. et Young, N. D.** (2005). Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* **137**, 1228–1235.
- Ghildiyal, M. et Zamore, P. D.** (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* **10**, 94–108.
- Ghildiyal, M., Seitz, H., Horwich, M. D., Li, C., Du, T., Lee, S., Xu, J., Kittler, E. L. W., Zapp, M. L., Weng, Z., et al.** (2008). Endogenous siRNAs Derived from Transposons and mRNAs in *Drosophila* Somatic Cells. *Science* **320**, 1077–1081.
- Goldberg, F., Grünewald, B., Rosenboom, H. et Menzel, R.** (1999). Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. *The Journal of Physiology* **514**, 759–768.
- Goñalons, C. M. et Farina, W. M.** (2015). Effects of Sublethal Doses of Imidacloprid on Young Adult Honeybee Behaviour. *PLOS ONE* **10**, e0140814.
- Gong, L., Chen, Y., Hu, Z. et Hu, M.** (2013). Testing Insecticidal Activity of Novel Chemically Synthesized siRNA against *Plutella xylostella* under Laboratory and Field Conditions. *PLOS ONE* **8**, e62990.
- Gordon, K. H. J. et Waterhouse, P. M.** (2007). RNAi for insect-proof plants. *Nat Biotechnol* **25**, 1231–1232.
- Gotti, C. et Clementi, F.** (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology* **74**, 363–396.
- Grandcolas, P.** (1996). The phylogeny of cockroach families: a cladistic appraisal of morpho-anatomical data. *Can. J. Zool.* **74**, 508–527.
- Grau-Bové, X. et Weetman, D.** (2020). RNA editing: an overlooked source of fine-scale adaptation in insect vectors? *Current Opinion in Insect Science* **40**, 48–55.
- Grauso, M., Reenan, R. A., Culetto, E. et Sattelle, D. B.** (2002). Novel Putative Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Genes, Da5, Da6 and Da7, 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**, 1519–1533.
- Green, W. N. et Wanamaker, C. P.** (1997). The Role of the Cystine Loop in Acetylcholine Receptor Assembly. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 20945–20953.
- Greenwood, R., Ford, M. G. et Scarr, A.** (2002). Neonicotinoid pharmacokinetics. *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* 153–160.
- Grigoraki, L., Pipini, D., Labbé, P., Chaskopoulou, A., Weill, M. et Vontas, J.** (2017). Carboxylesterase gene amplifications associated with insecticide resistance in *Aedes albopictus*: Geographical distribution and evolutionary origin. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **11**, e0005533.

- Grolleau, F. et Lapied, B.** (2000). Dorsal unpaired median neurones in the insect central nervous system: towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *Journal of Experimental Biology* **203**, 1633–1648.
- Grolleau, F., Lapied, B., Buckingham, S. D., Mason, W. T. et Sattelle, D. B.** (1996). Nicotine increases $[Ca^{2+}]_i$ and regulates electrical activity in insect neurosecretory cells (DUM neurons) via an acetylcholine receptor with 'mixed' nicotinic-muscarinic pharmacology. *Neuroscience Letters* **220**, 142–146.
- Gu, J., Liu, M., Deng, Y., Peng, H. et Chen, X.** (2011). Development of an Efficient Recombinant Mosquito Dengovirus-Mediated RNA Interference System and Its Preliminary Application in Mosquito Control. *PLOS ONE* **6**, e21329.
- Gu, S., Matta, J. A., Lord, B., Harrington, A. W., Sutton, S. W., Davini, W. B. et Brecht, D. S.** (2016). Brain $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Assembly Requires NACHO. *Neuron* **89**, 948–955.
- Guan, R., Hu, S., Li, H., Shi, Z. et Miao, X.** (2018). The in vivo dsRNA Cleavage Has Sequence Preference in Insects. *Frontiers in Physiology* **9**,.
- Gurusamy, D., Mogilicherla, K., Shukla, J. N. et Palli, S. R.** (2020a). Lipids help double-stranded RNA in endosomal escape and improve RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **104**, e21678.
- Gurusamy, D., Mogilicherla, K. et Palli, S. R.** (2020b). Chitosan nanoparticles help double-stranded RNA escape from endosomes and improve RNA interference in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **104**, e21677.

- H -

- Ha, Z. Y., Mathew, S. et Yeong, K. Y.** (2020). Butyrylcholinesterase: A Multifaceted Pharmacological Target and Tool. *Current Protein & Peptide Science* **21**, 99–109.
- Hafeez, M., Ullah, F., Khan, M. M., Li, X., Zhang, Z., Shah, S., Imran, M., Assiri, M. A., Fernández-Grandon, G. M., Desneux, N., et al.** (2022). Metabolic-based insecticide resistance mechanism and ecofriendly approaches for controlling of beet armyworm *Spodoptera exigua*: a review. *Environ Sci Pollut Res* **29**, 1746–1762.
- Hales, D. F., Wilson, A. C. C., Sloane, M. A., Simon, J.-C., Legallic, J.-F. et Sunnucks, P.** (2002). Lack of detectable genetic recombination on the X chromosome during the parthenogenetic production of female and male aphids. *Genetics Research* **79**, 203–209.
- Halevi, S., McKay, J., Palfreyman, M., Yassin, L., Eshel, M., Jorgensen, E. et Treinin, M.** (2002). The *C.elegans ric-3* gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *The EMBO Journal* **21**, 1012–1020.
- Han, Q., Wong, D. M., Robinson, H., Ding, H., Lam, P. C. H., Totrov, M. M., Carlier, P. R. et Li, J.** (2018). Crystal structure of acetylcholinesterase catalytic subunits of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Science* **25**, 721–724.
- Harel, M., Sussman, J. L., Krejci, E., Bon, S., Chanal, P., Massoulié, J. et Silman, I.** (1992). Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: modeling and mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 10827–10831.
- Harel, M., Kryger, G., Rosenberry, T. L., Mallender, W. D., Lewis, T., Fletcher, R. J., Guss, J. M., Silman, I. et Sussman, J. L.** (2000). Three-dimensional structures of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. *Protein Science* **9**, 1063–1072.

- Harrison, M. C., Jongepier, E., Robertson, H. M., Arning, N., Bitard-Feildel, T., Chao, H., Childers, C. P., Dinh, H., Doddapaneni, H., Dugan, S., et al.** (2018). Hemimetabolous genomes reveal molecular basis of termite eusociality. *Nat Ecol Evol* **2**, 557–566.
- Haugstetter, J., Blicher, T. et Elgaard, L.** (2005). Identification and characterization of a novel thioredoxin-related transmembrane protein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **280**, 8371–8380.
- Hawkins, J., Mitchell, E. L. et Jones, A. K.** (2022). NACHO permits functional heterologous expression of an insect homomeric $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptor. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **181**, 105030.
- He, G., Sun, Y. et Li, F.** (2012). RNA interference of two acetylcholinesterase genes in *Plutella xylostella* reveals their different functions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **79**, 75–86.
- He, C., Xie, W., Yang, X., Wang, S.-L., Wu, Q.-J. et Zhang, Y.-J.** (2018). Identification of glutathione S-transferases in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and evidence that GSTd7 helps explain the difference in insecticide susceptibility between *B. tabaci* Middle East-Minor Asia 1 and Mediterranean. *Insect Molecular Biology* **27**, 22–35.
- He, W., Xu, W., Fu, K., Guo, W. et Zhang, J.** (2020). Low Mismatch Rate between Double-Stranded RNA and Target mRNA Does Not Affect RNA Interference Efficiency in Colorado Potato Beetle. *Insects* **11**, 449.
- Head, G. P., Carroll, M. W., Evans, S. P., Rule, D. M., Willse, A. R., Clark, T. L., Storer, N. P., Flannagan, R. D., Samuel, L. W. et Meinke, L. J.** (2017). Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Management Science* **73**, 1883–1899.
- Heinrich, R., Hedwig, B. et Elsner, N.** (1997). Cholinergic activation of stridulatory behaviour in the grasshopper *Omocestus viridulus* (L.). *Journal of Experimental Biology* **200**, 1327–1337.
- Hemingway, J.** (2000). The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 1009–1015.
- Hermans-Borgmeyer, I., Zopf, D., Ryseck, R.-P., Hovemann, B., Betz, H. et Gundelfinger, E. D.** (1986). Primary structure of a developmentally regulated nicotinic acetylcholine receptor protein from *Drosophila*. *The EMBO Journal* **5**, 1503–1508.
- Hernández-Soto, A. et Chacón-Cerdas, R.** (2021). RNAi Crop Protection Advances. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 12148.
- Hirata, K., Kiyota, R., Matsuura, A., Toda, S., Yamamoto, A. et Iwasa, T.** (2015). Association between the R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit of *Aphis gossypii* and the differential resistance to acetamiprid and imidacloprid. *Journal of Pesticide Science* **40**, 25–31.
- Hirata, K., Jouraku, A., Kuwazaki, S., Kanazawa, J. et Iwasa, T.** (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**, 57–65.
- Holt, R. A., Subramanian, G. M., Halpern, A., Sutton, G. G., Charlab, R., Nuskern, D. R., Wincker, P., Clark, A. G., Ribeiro, JoséM. C., Wides, R., et al.** (2002). The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 129–149.
- Hoopengardner, B., Bhalla, T., Staber, C. et Reenan, R.** (2003). Nervous System Targets of RNA Editing Identified by Comparative Genomics. *Science* **301**, 832–836.
- Houchat, J.-N., Dissanamossi, B. M., Landagaray, E., Mathé-Allainmat, M., Cartereau, A., Graton, J., Lebreton, J., Le Questel, J.-Y. et Thany, S. H.** (2019). Mode of action of sulfoxaflor on α -bungarotoxin-insensitive nAChR1 and nAChR2 subtypes: Inhibitory effect of imidacloprid. *NeuroToxicology* **74**, 132–138.

- Houchat, J.-N., Cartereau, A., Taillebois, E. et Thany, S. H.** (2022). Calmidazolium induces a decrease in nicotine-induced currents and intracellular calcium levels after pulse application of nicotine onto insect neurosecretory cells. *Journal of Insect Physiology* **139**, 104385.
- Huang, J.-H. et Lee, H.-J.** (2011). RNA interference unveils functions of the hypertrehalosemic hormone on cyclic fluctuation of hemolymph trehalose and oviposition in the virgin female *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology* **57**, 858–864.
- Huang, J.-H., Liu, Y., Lin, Y.-H., Belles, X. et Lee, H.-J.** (2018). Practical Use of RNA Interference: Oral Delivery of Double-stranded RNA in Liposome Carriers for Cockroaches. *JoVE* 57385.
- Huchard, E., Martinez, M., Alout, H., Douzery, E. J. P., Lutfalla, G., Berthomieu, A., Berticat, C., Raymond, M. et Weill, M.** (2006). Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**, 2595–2604.
- Hucho, F. et Changeux, J.-P.** (1973). Molecular weight and quaternary structure of the cholinergic receptor protein extracted by detergents from *Electrophorus electricus* electric tissue. *FEBS Letters* **38**, 11–15.
- Hui, X.-M., Yang, L.-W., He, G.-L., Yang, Q.-P., Han, Z.-J. et Li, F.** (2011). RNA interference of *ace1* and *ace2* in *Chilo suppressalis* reveals their different contributions to motor ability and larval growth. *Insect Molecular Biology* **20**, 507–518.
- Hyun, S.** (2017). Small RNA Pathways That Protect the Somatic Genome. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 912.

- I -

- Ihara, M. et Matsuda, K.** (2018). Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact on pollinators. *Current Opinion in Insect Science* **30**, 86–92.
- Ihara, M., Matsuda, K., Otake, M., Kuwamura, M., Shimomura, M., Komai, K., Akamatsu, M., Raymond, V. et Sattelle, D. B.** (2003). Diverse actions of neonicotinoids on chicken $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and *Drosophila*-chicken $SAD\beta 2$ and $ALS\beta 2$ hybrid nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Neuropharmacology* **45**, 133–144.
- Ihara, M., Matsuda, K., Shimomura, M., Sattelle, D. B. et Komai, K.** (2004). Super Agonist Actions of Clothianidin and Related Compounds on the $SAD\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **68**, 761–763.
- Ihara, M., Brown, L. A., Ishida, C., Okuda, H., Sattelle, D. B. et Matsuda, K.** (2006). Actions of imidacloprid, clothianidin and related neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors of American cockroach neurons and their relationships with insecticidal potency. *Journal of Pesticide Science* **31**, 35–40.
- Ihara, M., Okajima, T., Yamashita, A., Oda, T., Asano, T., Matsui, M., Sattelle, D. B. et Matsuda, K.** (2014). Studies on an Acetylcholine Binding Protein Identify a Basic Residue in Loop G on the $\beta 1$ Strand as a New Structural Determinant of Neonicotinoid Actions. *Mol Pharmacol* **86**, 736–746.
- Ihara, M., Sattelle, D. B. et Matsuda, K.** (2015). Probing new components (loop G and the α - α interface) of neonicotinoid binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **121**, 47–52.
- Ihara, M., Buckingham, S. D., Matsuda, K. et Sattelle, D. B.** (2017). Modes of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current Medicinal Chemistry* **24**, 2925–2934.

Ihara, M., Furutani, S., Shigetou, S., Shimada, S., Niki, K., Komori, Y., Kamiya, M., Koizumi, W., Magara, L., Hikida, M., 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* **117**, 16283–16291.

Inkson, C. A., Brabbs, A. C., Grewal, T. S., Skerry, T. M. et Genever, P. G. (2004). Characterization of acetylcholinesterase expression and secretion during osteoblast differentiation. *Bone* **35**, 819–827.

Ivashuta, S., Zhang, Y., Wiggins, B. E., Ramaseshadri, P., Segers, G. C., Johnson, S., Meyer, S. E., Kerstetter, R. A., McNulty, B. C., Bolognesi, R., et al. (2015). Environmental RNAi in herbivorous insects. *RNA* **21**, 840–850.

- J -

Jacob, F. et Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**, 318–356.

Jankowska, M., Augustyn, B., Maliszewska, J., Przeździecka, B., Kubiak, D., Chełchowska, O., Kaczorek, J., Knop, D., Krajnik, K., Kletkiewicz, H., et al. (2023). Sublethal biochemical, behavioral, and physiological toxicity of extremely low dose of bendiocarb insecticide in *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae). *Environ Sci Pollut Res* **30**, 47742–47754.

Jaquière, J., Rispe, C., Roze, D., Legeai, F., Trionnaire, G. L., Stoeckel, S., Mieuze, L., Silva, C. D., Poulain, J., Prunier-Leterme, N., et al. (2013). Masculinization of the X Chromosome in the Pea Aphid. *PLoS Genetics* **9**, e1003690.

Jensen, M. L., Schousboe, A. et Ahring, P. K. (2005). Charge selectivity of the Cys-loop family of ligand-gated ion channels. *Journal of Neurochemistry* **92**, 217–225.

Jepson, J. E. C., Brown, L. A. et Sattelle, David. B. (2006). The actions of the neonicotinoid imidacloprid on cholinergic neurons of *Drosophila melanogaster*. *Invert Neurosci* **6**, 33–40.

Jiang, H. et Zhang, X.-J. (2008). Acetylcholinesterase and apoptosis. *The FEBS Journal* **275**, 612–617.

Jiang, X., Qu, M., Denholm, I., Fang, J., Jiang, W. et Han, Z. (2009). Mutation in acetylcholinesterase1 associated with triazophos resistance in rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **378**, 269–272.

Jin, Y., Tian, N., Cao, J., Liang, J., Yang, Z. et Lv, J. (2007). RNA editing and alternative splicing of the insect nAChR subunit alpha6 transcript: evolutionary conservation, divergence and regulation. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 98.

Joga, M. R., Zotti, M. J., Smagghe, G. et Christiaens, O. (2016). RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Frontiers in Physiology* **7**.

Jones, A. K. (2018). Genomics, cys-loop ligand-gated ion channels and new targets for the control of insect pests and vectors. *Current Opinion in Insect Science* **30**, 1–7.

Jones, A. K. et Sattelle, D. B. (2007). The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics* **8**, 327.

Jones, A. K. et Sattelle, D. B. (2010). Diversity of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits. In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors* (ed. Thany, S. H.), pp. 25–43. New York, NY: Springer.

Jones, A. K., Grauso, M. et Sattelle, D. B. (2005). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* **85**, 176–187.

- Jones, A. K., Raymond-Delpech, V., Thany, S. H., Gauthier, M. et Sattelle, D. B.** (2006). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res.* **16**, 1422–1430.
- Jones, A. K., Brown, L. A. et Sattelle, D. B.** (2007a). Insect nicotinic acetylcholine receptor gene families: from genetic model organism to vector, pest and beneficial species. *Invert Neurosci* **7**, 67–73.
- Jones, A. K., Davis, P., Hodgkin, J. et Sattelle, D. B.** (2007b). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode *Caenorhabditis elegans*: an update on nomenclature. *Invert Neurosci* **7**, 129–131.
- Jones, A. K., Buckingham, S. D. et Sattelle, D. B.** (2010). Proteins interacting with nicotinic acetylcholine receptors: expanding functional and therapeutic horizons. *Trends in Pharmacological Sciences* **31**, 455–462.
- Jones, A. K., Goven, D., Froger, J., Bantz, A. et Raymond, V.** (2021). The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamilies of the cockroaches *BLATTELLA GERMANICA* and *PERIPLANETA AMERICANA*. *Pest Manag Sci* **77**, 3787–3799.

- K -

- Kagabu, S.** (2011). Discovery of Imidacloprid and Further Developments from Strategic Molecular Designs. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 2887–2896.
- Kandasamy, S. K. et Fukunaga, R.** (2016). Phosphate-binding pocket in Dicer-2 PAZ domain for high-fidelity siRNA production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 14031–14036.
- Kandeel, M., Al-Taher, A., Nakashima, R., Sakaguchi, T., Kandeel, A., Nagaya, Y., Kitamura, Y. et Kitade, Y.** (2014). Bioenergetics and Gene Silencing Approaches for Unraveling Nucleotide Recognition by the Human EIF2C2/Ago2 PAZ Domain. *PLOS ONE* **9**, e94538.
- Kapitonov, V. V. et Jurka, J.** (2003). Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 6569–6574.
- Karlin, A., Cox, R. N., Dipaola, M., Holtzman, E., Kao, P. N., Lobel, P., Wang, L. et Yodh, N.** (1986). Functional Domains of the Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* **463**, 53–69.
- Kasai, M. et Changeux, J.-P.** (1971). In Vitro excitation of purified membrane fragments by cholinergic agonists. *J. Membrain Biol.* **6**, 24–57.
- Katis, N. I., Tsitsipis, J. A., Stevens, M. et Powell, G.** (2007). Transmission of plant viruses. *Aphids as crop pests* 353–390.
- Keene, K. M., Foy, B. D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B. J., Blair, C. D. et Olson, K. E.** (2004). RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 17240–17245.
- Kennerdell, J. R. et Carthew, R. W.** (1998). Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the Wingless Pathway. *Cell* **95**, 1017–1026.
- Khajuria, C., Vélez, A. M., Rangasamy, M., Wang, H., Fishilevich, E., Frey, M. L. F., Carneiro, N. P., Gandra, P., Narva, K. E. et Siegfried, B. D.** (2015). Parental RNA interference of genes involved in embryonic development of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **63**, 54–62.

- Khajuria, C., Ivashuta, S., Wiggins, E., Flagel, L., Moar, W., Pleau, M., Miller, K., Zhang, Y., Ramaseshadri, P., Jiang, C., et al.** (2018). Development and characterization of the first dsRNA-resistant insect population from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *PLoS ONE* **13**, e0197059.
- Khan, A. M., Ashfaq, M., Kiss, Z., Khan, A. A., Mansoor, S. et Falk, B. W.** (2013). Use of Recombinant Tobacco Mosaic Virus To Achieve RNA Interference in Plants against the Citrus Mealybug, *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). *PLOS ONE* **8**, e73657.
- Killiny, N., Hajeri, S., Tiwari, S., Gowda, S. et Stelinski, L. L.** (2014). Double-Stranded RNA Uptake through Topical Application, Mediates Silencing of Five CYP4 Genes and Suppresses Insecticide Resistance in *Diaphorina citri*. *PLoS ONE* **9**, e110536.
- Kim, Y. H. et Lee, S. H.** (2013). Which acetylcholinesterase functions as the main catalytic enzyme in the Class Insecta? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **43**, 47–53.
- Kim, J. I., Jung, C. S., Koh, Y. H. et Lee, S. H.** (2006). Molecular, biochemical and histochemical characterization of two acetylcholinesterase cDNAs from the German cockroach *Blattella germanica*. *Insect Molecular Biology* **15**, 513–522.
- King, A. M. et Aaron, C. K.** (2015). Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Emergency Medicine Clinics of North America* **33**, 133–151.
- Kingsolver, M. B., Huang, Z. et Hardy, R. W.** (2013). Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *J Mol Biol* **425**, 4921–4936.
- Knorr, D. Y., Georges, N. S., Pauls, S. et Heinrich, R.** (2020). Acetylcholinesterase promotes apoptosis in insect neurons. *Apoptosis* **25**, 730–746.
- Knorr, D. Y., Schneider, K., Büschgens, L., Förster, J., Georges, N. S., Geurten, B. R. H. et Heinrich, R.** (2022). Protection of insect neurons by erythropoietin/CRLF3-mediated regulation of pro-apoptotic acetylcholinesterase. *Sci Rep* **12**, 18565.
- Kobayashi, I., Tsukioka, H., Kômoto, N., Uchino, K., Sezutsu, H., Tamura, T., Kusakabe, T. et Tomita, S.** (2012). SID-1 protein of *Caenorhabditis elegans* mediates uptake of dsRNA into *Bombyx* cells. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **42**, 148–154.
- Kolliopoulou, A., Taning, C. N. T., Smagghe, G. et Swevers, L.** (2017). Viral Delivery of dsRNA for Control of Insect Agricultural Pests and Vectors of Human Disease: Prospects and Challenges. *Frontiers in Physiology* **8**,.
- Kolliopoulou, A., Kontogiannatos, D. et Swevers, L.** (2020). The Use of Engineered Plant Viruses in a Trans-Kingdom Silencing Strategy Against Their Insect Vectors. *Frontiers in Plant Science* **11**,.
- Komori, Y., Takayama, K., Okamoto, N., Kamiya, M., Koizumi, W., Ihara, M., Misawa, D., Kamiya, K., Yoshinari, Y., Seike, K., et al.** (2023). Functional impact of subunit composition and compensation on *Drosophila melanogaster* nicotinic receptors—targets of neonicotinoids. *PLOS Genetics* **19**, e1010522.
- Kontogiannatos, D., Swevers, L., Maenaka, K., Park, E. Y., Iatrou, K. et Kourti, A.** (2013). Functional Characterization of a Juvenile Hormone Esterase Related Gene in the Moth *Sesamia nonagrioides* through RNA Interference. *PLOS ONE* **8**, e73834.
- Kryger, G., Harel, M., Giles, K., Toker, L., Velan, B., Lazar, A., Kronman, C., Barak, D., Ariel, N., Shafferman, A., et al.** (2000). Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Cryst D* **56**, 1385–1394.
- Kumar, M., Gupta, G. P. et Rajam, M. V.** (2009). Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *Journal of Insect Physiology* **55**, 273–278.

- Kunte, N., McGraw, E., Bell, S., Held, D. et Avila, L.-A.** (2020). Prospects, challenges and current status of RNAi through insect feeding. *Pest Management Science* **76**, 26–41.
- Kurzynska-Kokorniak, A., Pokornowska, M., Koralewska, N., Hoffmann, W., Bienkowska-Szewczyk, K. et Figlerowicz, M.** (2016). Revealing a new activity of the human Dicer DUF283 domain in vitro. *Sci Rep* **6**, 23989.
- Kwak, P. B. et Tomari, Y.** (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 145–151.
- Kweon, H.-J., Gu, S., Witham, E., Dhara, M., Yu, H., Mandon, E. D., Jawhari, A. et Bredt, D. S.** (2020). NACHO Engages N-Glycosylation ER Chaperone Pathways for $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Assembly. *Cell Reports* **32**, 108025.

- L -

- Lalouette, L., Pottier, M.-A., Wycke, M.-A., Boitard, C., Bozzolan, F., Maria, A., Demondion, E., Chertemps, T., Lucas, P., Renault, D., et al.** (2016). Unexpected effects of sublethal doses of insecticide on the peripheral olfactory response and sexual behavior in a pest insect. *Environ Sci Pollut Res* **23**, 3073–3085.
- Lan, J., Wang, Z., Chen, Z., Zhang, L., Zhao, J., Guan, Q., Liao, C., Liu, N. et Han, Q.** (2021). Identification of the *Aedes aegypti* nAChR gene family and molecular target of spinosad. *Pest Management Science* **77**, 1633–1641.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.
- Langley, J. N.** (1905). On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *The Journal of Physiology* **33**, 374–413.
- Langley, J. N.** (1907). On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of 'receptive' substances. *The Journal of Physiology* **36**, 347–384.
- Lansdell, S. J. et Millar, N. S.** (2000). Cloning and heterologous expression of Dalpha4, a *Drosophila* neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacology* **39**, 2604–2614.
- Lansdell, S. J., Collins, T., Goodchild, J. et Millar, N. S.** (2012). The *Drosophila* nicotinic acetylcholine receptor subunits Da5 and Da7 form functional homomeric and heteromeric ion channels. *BMC Neuroscience* **13**, 73.
- Lapied, B., Le Corrionc, H. et Hue, B.** (1990). Sensitive nicotinic and mixed nicotinic-muscarinic receptors in insect neurosecretory cells. *Brain Research* **533**, 132–136.
- Lapied, B., Defaix, A., Stankiewicz, M., Moreau, E. et Raymond, V.** (2017). Modulation of Low-Voltage-Activated Inward Current Permeable to Sodium and Calcium by DARPP-32 Drives Spontaneous Firing of Insect Octopaminergic Neurosecretory Cells. *Frontiers in Systems Neuroscience* **11**, .
- Lavialle-Defaix, C., Gautier, H., Defaix, A., Lapied, B. et Grolleau, F.** (2006). Differential Regulation of Two Distinct Voltage-Dependent Sodium Currents by Group III Metabotropic Glutamate Receptor Activation in Insect Pacemaker Neurons. *Journal of Neurophysiology* **96**, 2437–2450.
- Lavialle-Defaix, C., Moignot, B., Legros, C. et Lapied, B.** (2010). How Does Calcium-Dependent Intracellular Regulation of Voltage-Dependent Sodium Current Increase the Sensitivity to the

Oxadiazine Insecticide Indoxacarb Metabolite Decarbomethoxylated JW062 (DCJW) in Insect Pacemaker Neurons? *J Pharmacol Exp Ther* **333**, 264–272.

- Lee, D. et O'Dowd, D. K.** (1999). Fast Excitatory Synaptic Transmission Mediated by Nicotinic Acetylcholine Receptors in *Drosophila* Neurons. *J. Neurosci.* **19**, 5311–5321.
- Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J. et Carthew, R. W.** (2004). Distinct Roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA Silencing Pathways. *Cell* **117**, 69–81.
- Lee, D.-W., Kim, S.-S., Shin, S. W., Kim, W. T. et Boo, K. S.** (2006). Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenée). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1760**, 125–133.
- Lee, S.-W., Kasai, S., Komagata, O., Kobayashi, M., Agui, N., Kono, Y. et Tomita, T.** (2007). Molecular Characterization of Two Acetylcholinesterase cDNAs in Pediculus Human Lice. *Journal of Medical Entomology* **44**, 72–79.
- Lee, S. H., Kim, Y. H., Kwon, D. H., Cha, D. J. et Kim, J. H.** (2015). Mutation and duplication of arthropod acetylcholinesterase: Implications for pesticide resistance and tolerance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **120**, 118–124.
- Leggewie, M. et Schnettler, E.** (2018). RNAi-mediated antiviral immunity in insects and their possible application. *Current Opinion in Virology* **32**, 108–114.
- Leska, A., Nowak, A., Nowak, I. et Górczyńska, A.** (2021). Effects of Insecticides and Microbiological Contaminants on *Apis mellifera* Health. *Molecules* **26**, 5080.
- Lev-Lehman, E., Evron, T., Broide, R. S., Meshorer, E., Ariel, I., Seidman, S. et Soreq, H.** (2000). Synaptogenesis and myopathy under acetylcholinesterase overexpression. *J Mol Neurosci* **14**, 93–105.
- Li, F. et Han, Z.-J.** (2002). Two different genes encoding acetylcholinesterase existing in cotton aphid (*Aphis gossypii*). *Genome* **45**, 1134–1141.
- Li, J., Shao, Y., Ding, Z., Bao, H., Liu, Z., Han, Z. et Millar, N. S.** (2010). Native subunit composition of two insect nicotinic receptor subtypes with differing affinities for the insecticide imidacloprid. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 17–22.
- Li, J., Chen, Q., Lin, Y., Jiang, T., Wu, G. et Hua, H.** (2011). RNA interference in *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) based on dsRNA ingestion. *Pest Management Science* **67**, 852–859.
- Li, D., Zhang, J., Wang, Y., Liu, X., Ma, E., Sun, Y., Li, S., Zhu, K. Y. et Zhang, J.** (2015a). Two chitinase 5 genes from *Locusta migratoria*: Molecular characteristics and functional differentiation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **58**, 46–54.
- Li, W., Koutmou, K. S., Leahy, D. J. et Li, M.** (2015b). Systemic RNA Interference Deficiency-1 (SID-1) Extracellular Domain Selectively Binds Long Double-stranded RNA and Is Required for RNA Transport by SID-1. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 18904–18913.
- Li, H., Bowling, A. J., Gandra, P., Rangasamy, M., Pence, H. E., McEwan, R. E., Khajuria, C., Siegfried, B. D. et Narva, K. E.** (2018a). Systemic RNAi in western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*, does not involve transitive pathways. *Insect Science* **25**, 45–56.
- Li, S., Zhu, S., Jia, Q., Yuan, D., Ren, C., Li, K., Liu, S., Cui, Y., Zhao, H., Cao, Y., et al.** (2018b). The genomic and functional landscapes of developmental plasticity in the American cockroach. *Nat Commun* **9**, 1008.
- Lin, Y.-H., Huang, J.-H., Liu, Y., Belles, X. et Lee, H.-J.** (2017). Oral delivery of dsRNA lipoplexes to German cockroach protects dsRNA from degradation and induces RNAi response. *Pest Management Science* **73**, 960–966.

- List, O., Calas-List, D., Taillebois, E., Juchaux, M., Heuland, E. et Thany, S. H.** (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**, 507–513.
- List, F., Tarone, A. M., Zhu-Salzman, K. et Vargo, E. L.** (2022). RNA meets toxicology: efficacy indicators from the experimental design of RNAi studies for insect pest management. *Pest Management Science* **78**, 3215–3225.
- Littleton, J. T. et Ganetzky, B.** (2000). Ion Channels and Synaptic Organization: Analysis of the *Drosophila* Genome. *Neuron* **26**, 35–43.
- Liu, N. et Scott, J. G.** (1998). Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 531–535.
- Liu, N. et Yue, X.** (2000). Insecticide Resistance and Cross-Resistance in the House Fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology* **93**, 1269–1275.
- Liu, Z., Williamson, M. S., Lansdell, S. J., Denholm, I., Han, Z. et Millar, N. S.** (2005). A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 8420–8425.
- Liu, Z., Williamson, M. S., Lansdell, S. J., Han, Z., Denholm, I. et Millar, N. S.** (2006). A nicotinic acetylcholine receptor mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoid insecticides. *Journal of Neurochemistry* **99**, 1273–1281.
- Liu, Z., Cao, G., Li, J., Bao, H. et Zhang, Y.** (2009). Identification of two *Lynx* proteins in *Nilaparvata lugens* and the modulation on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Neurochemistry* **110**, 1707–1714.
- Liu, N., Li, T., Reid, W. R., Yang, T. et Zhang, L.** (2011). Multiple Cytochrome P450 Genes: Their Constitutive Overexpression and Permethrin Induction in Insecticide Resistant Mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *PLOS ONE* **6**, e23403.
- Liu, J., Smaghe, G. et Swevers, L.** (2013). Transcriptional response of BmToll9-1 and RNAi machinery genes to exogenous dsRNA in the midgut of *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* **59**, 646–654.
- Loewi, O. et Navratil, E.** (1926). Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflüger's Arch.* **214**, 678–688.
- Longhurst, C., Babcock, J. M., Denholm, I., Gorman, K., Thomas, J. D. et Sparks, T. C.** (2013). Cross-resistance relationships of the sulfoximine insecticide sulfoxaflor with neonicotinoids and other insecticides in the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum*. *Pest Management Science* **69**, 809–813.
- Louis, T., Musso, P.-Y., de Oliveira, S. B., Garreau, L., Giurfa, M., Raymond, V. et Gauthier, M.** (2012). Amel8 subunit knockdown in the mushroom body vertical lobes impairs olfactory retrieval in the honeybee, *Apis mellifera*. *European Journal of Neuroscience* **36**, 3438–3450.
- Lozano, V., Armengaud, C. et Gauthier, M.** (2001). Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *J Comp Physiol A* **187**, 249–254.
- Lu, Y., Pang, Y.-P., Park, Y., Gao, X., Yao, J., Zhang, X. et Zhu, K. Y.** (2012a). Genome Organization, Phylogenies, Expression Patterns, and Three-Dimensional Protein Models of Two Acetylcholinesterase Genes from the Red Flour Beetle. *PLOS ONE* **7**, e32288.
- Lu, Y., Park, Y., Gao, X., Zhang, X., Yao, J., Pang, Y.-P., Jiang, H. et Zhu, K. Y.** (2012b). Cholinergic and non-cholinergic functions of two acetylcholinesterase genes revealed by gene-silencing in *Tribolium castaneum*. *Sci Rep* **2**, 288.

Lu, X.-P., Wang, L.-L., Huang, Y., Dou, W., Chen, C.-T., Wei, D. et Wang, J.-J. (2016). The epsilon glutathione S-transferases contribute to the malathion resistance in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **180**, 40–48.

Luo, Y., Wang, X., Wang, X., Yu, D., Chen, B. et Kang, L. (2013). Differential responses of migratory locusts to systemic RNA interference via double-stranded RNA injection and feeding. *Insect Molecular Biology* **22**, 574–583.

- M -

Ma, K., Tang, Q., Zhang, B., Liang, P., Wang, B. et Gao, X. (2019). Overexpression of multiple cytochrome P450 genes associated with sulfoxaflor resistance in *Aphis gossypii* Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **157**, 204–210.

Macedo, L. L. P., Antonino de Souza Junior, J. D., Coelho, R. R., Fonseca, F. C. A., Firmino, A. A. P., Silva, M. C. M., Fragoso, R. R., Albuquerque, E. V. S., Silva, M. S., de Almeida Engler, J., et al. (2017). Knocking down chitin synthase 2 by RNAi is lethal to the cotton boll weevil. *Biotechnology Research and Innovation* **1**, 72–86.

MacRae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D. et Doudna, J. A. (2006). Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science* **311**, 195–198.

Mannai, S., Bitri, L. et 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* **137**, 931–938.

Marques, J. T., Kim, K., Wu, P.-H., Alleyne, T. M., Jafari, N. et Carthew, R. W. (2010). Loqs and R2D2 act sequentially in the siRNA pathway in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 24–30.

Martín, D., Maestro, O., Cruz, J., Mané-Padrós, D. et Bellés, X. (2006). RNAi studies reveal a conserved role for RXR in molting in the cockroach *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology* **52**, 410–416.

Martinez, Z., De Schutter, K., Van Damme, E. J. M., Vogel, E., Wynant, N., Vanden Broeck, J., Christiaens, O. et Smagghe, G. (2021). Accelerated delivery of dsRNA in lepidopteran midgut cells by a *Galanthus nivalis* lectin (GNA)-dsRNA-binding domain fusion protein. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **175**, 104853.

Masson, P., Carletti, E. et Nachon, F. (2009). Structure, Activities and Biomedical Applications of Human Butyrylcholinesterase. *Protein & Peptide Letters* **16**, 1215–1224.

Massoulié, J. (2002). The Origin of the Molecular Diversity and Functional Anchoring of Cholinesterases. *NSG* **11**, 130–143.

Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. et Vallette, F.-M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology* **41**, 31–91.

Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P. et Zamore, P. D. (2005). Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. *Cell* **123**, 607–620.

Matsuda, K. (2021). Robust functional expression of insect nicotinic acetylcholine receptors provides new insights into neonicotinoid actions and new opportunities for pest and vector control. *Pest Management Science* **77**, 3626–3630.

- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Freeman, J. C., Squire, M. D., Baylis, H. A. et Sattelle, D. B.** (1998). Effects of the α subunit on imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology* **123**, 518–524.
- Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M. et Sattelle, D. B.** (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **22**, 573–580.
- Matsuda, K., Kanaoka, S., Akamatsu, M. et Sattelle, D. B.** (2009). Diverse Actions and Target-Site Selectivity of Neonicotinoids: Structural Insights. *Mol Pharmacol* **76**, 1–10.
- Matsuda, K., Ihara, M. et Sattelle, D. B.** (2020). Neonicotinoid Insecticides: Molecular Targets, Resistance, and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 241–255.
- Matta, J. A., Gu, S., Davini, W. B., Lord, B., Siuda, E. R., Harrington, A. W. et Bredt, D. S.** (2017). NACHO Mediates Nicotinic Acetylcholine Receptor Function throughout the Brain. *Cell Reports* **19**, 688–696.
- McEwan, D. L., Weisman, A. S. et Hunter, C. P.** (2012). Uptake of Extracellular Double-Stranded RNA by SID-2. *Molecular Cell* **47**, 746–754.
- McFarlane, M., Arias-Goeta, C., Martin, E., O’Hara, Z., Lulla, A., Mousson, L., Rainey, S. M., Misbah, S., Schnettler, E., Donald, C. L., et al.** (2014). Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2994.
- Meister, G.** (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* **14**, 447–459.
- Melander, A. L.** (1914). Can Insects Become Resistant to Sprays? *Journal of Economic Entomology* **7**, 167–173.
- Meunier, J.-C., Sealock, R., Olsen, R. et Changeux, J.-P.** (1974). Purification and Properties of the Cholinergic Receptor Protein from *Electrophorus electricus* Electric Tissue. *European Journal of Biochemistry* **45**, 371–394.
- Mezei, I., Valverde-Garcia, P., Siebert, M. W., Gomez, L. E., Torne, M., Watson, G. B., Raquel, A. M., Fereres, A. et Sparks, T. C.** (2022). Impact of the nicotinic acetylcholine receptor mutation R81T on the response of European *Myzus persicae* populations to imidacloprid and sulfoxaflor in laboratory and in the field. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **187**, 105187.
- Millar, N. S.** (2008). RIC-3: a nicotinic acetylcholine receptor chaperone. *British Journal of Pharmacology* **153**, S177–S183.
- Millar, N. S.** (2009). A review of experimental techniques used for the heterologous expression of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* **78**, 766–776.
- Millar, N. S. et Denholm, I.** (2007). Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert Neurosci* **7**, 53–66.
- Millar, N. S. et Gotti, C.** (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **56**, 237–246.
- Millar, N. S. et Lansdell, S. J.** (2010). Characterisation of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors by Heterologous Expression. In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors* (ed. Thany, S. H.), pp. 65–73. New York, NY: Springer.
- Miller, S. C., Miyata, K., Brown, S. J. et Tomoyasu, Y.** (2012). Dissecting Systemic RNA Interference in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*: Parameters Affecting the Efficiency of RNAi. *PLOS ONE* **7**, e47431.

- Mishina, M., Kurosaki, T., Tobimatsu, T., Morimoto, Y., Noda, M., Yamamoto, T., Terao, M., Lindstrom, J., Takahashi, T., Kuno, M., et al.** (1984). Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature* **307**, 604–608.
- Mitchell, E. L., Viscarra, F., Bermudez, I., Hawkins, J., Goodchild, J. A. et Jones, A. K.** (2022). The *Apis mellifera* alpha 5 nicotinic acetylcholine receptor subunit expresses as a homomeric receptor that is sensitive to serotonin. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **182**, 105055.
- Miwa, J. M., Stevens, T. R., King, S. L., Caldarone, B. J., Ibanez-Tallon, I., Xiao, C., Fitzsimonds, R. M., Pavlides, C., Lester, H. A., Picciotto, M. R., et al.** (2006). The Prototoxin lynx1 Acts on Nicotinic Acetylcholine Receptors to Balance Neuronal Activity and Survival In Vivo. *Neuron* **51**, 587–600.
- Miyata, K., Ramaseshadri, P., Zhang, Y., Segers, G., Bolognesi, R. et Tomoyasu, Y.** (2014). Establishing an In Vivo Assay System to Identify Components Involved in Environmental RNA Interference in the Western Corn Rootworm. *PLOS ONE* **9**, e101661.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. et Unwin, N.** (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949–955.
- Mongan, N. P., Jones, A. K., Smith, G. R., Sansom, M. S. P. et Sattelle, D. B.** (2002). Novel $\alpha 7$ -like nicotinic acetylcholine receptor subunits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Protein Science* **11**, 1162–1171.
- Moreau, E., Mikulska-Ruminska, K., Goulu, M., Perrier, S., Deshayes, C., Stankiewicz, M., Apaire-Marchais, V., Nowak, W. et Lapied, B.** (2020). Orthosteric muscarinic receptor activation by the insect repellent IR3535 opens new prospects in insecticide-based vector control. *Sci Rep* **10**, 6842.
- Mori, A., Lobo, N. F., deBruyn, B. et Severson, D. W.** (2007). Molecular cloning and characterization of the complete acetylcholinesterase gene (*Ace1*) from the mosquito *Aedes aegypti* with implications for comparative genome analysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**, 667–674.
- Mou, X., Yuan, G.-R., Jiang, H.-B., Liu, Z. et Wang, J.-J.** (2017). Functional characterization of two acetylcholinesterase genes in the brown citrus aphid, *Aphis (Toxoptera) citricidus* (Kirkaldy), using heterologous expression and RNA interference. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **138**, 76–83.
- Murillo, L., Hamon, A., Es-Salah-Lamoureux, Z., Itier, V., Quinchard, S. et Lapied, B.** (2011). Inhibition of protein kinase C decreases sensitivity of GABA receptor subtype to fipronil insecticide in insect neurosecretory cells. *NeuroToxicology* **32**, 828–835.
- Mustard, J. A., Gott, A., Scott, J., Chavarria, N. L. et Wright, G. A.** (2020). Honeybees fail to discriminate floral scents in a complex learning task after consuming a neonicotinoid pesticide. *Journal of Experimental Biology* **223**, jeb217174.

- N -

- Nabeshima, T., Kozaki, T., Tomita, T. et Kono, Y.** (2003). An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307**, 15–22.
- Nabeshima, T., Mori, A., Kozaki, T., Iwata, Y., Hidoh, O., Harada, S., Kasai, S., Severson, D. W., Kono, Y. et Tomita, T.** (2004). An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 794–801.

- Nachon, F., Stojan, J. et Fournier, D.** (2008). Insights into substrate and product traffic in the *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase active site gorge by enlarging a back channel. *The FEBS Journal* **275**, 2659–2664.
- Nachon, F., Rosenberry, T. L., Silman, I. et Sussman, J. L.** (2020). A Second Look at the Crystal Structures of *Drosophila melanogaster* Acetylcholinesterase in Complex with Tacrine Derivatives Provides Insights Concerning Catalytic Intermediates and the Design of Specific Insecticides. *Molecules* **25**, 1198.
- Nandety, R. S., Kuo, Y.-W., Nouri, S. et Falk, B. W.** (2014). Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioengineered* **6**, 8–19.
- Napoli, C., Lemieux, C. et Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279–289.
- Narayan, S., Liew, Z., Bronstein, J. M. et Ritz, B.** (2017). Occupational pesticide use and Parkinson's disease in the Parkinson Environment Gene (PEG) study. *Environment International* **107**, 266–273.
- Nardini, L., Hunt, R. H., Dahan-Moss, Y. L., Christie, N., Christian, R. N., Coetzee, M. et Koekemoer, L. L.** (2017). Malaria vectors in the Democratic Republic of the Congo: the mechanisms that confer insecticide resistance in *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus*. *Malaria Journal* **16**, 448.
- Nations Unies, Département des Affaires Economiques et Sociales, La Division de la Population** (2022). World Population Prospects 2022: Summary of Results. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V. L. et Kaussmann, M.** (2003). Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **76**, 55–69.
- Nault, L. R.** (1997). Arthropod Transmission of Plant Viruses: a New Synthesis. *Annals of the Entomological Society of America* **90**, 521–541.
- Nene, V., Wortman, J. R., Lawson, D., Haas, B., Kodira, C., Tu, Z. (Jake), Loftus, B., Xi, Z., Megy, K., Grabherr, M., et al.** (2007). Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vector. *Science* **316**, 1718–1723.
- Ninova, M., Griffiths-Jones, S. et Ronshaugen, M.** (2017). Abundant expression of somatic transposon-derived piRNAs throughout *Tribolium castaneum* embryogenesis. *Genome Biology* **18**, 184.
- Nishide, Y., Kageyama, D., Tanaka, Y., Yokoi, K., Jouraku, A., Futahashi, R. et Fukatsu, T.** (2021). Effectiveness of orally-delivered double-stranded RNA on gene silencing in the stinkbug *Plautia stali*. *PLOS ONE* **16**, e0245081.
- Nishikura, K.** (2010). Functions and Regulation of RNA Editing by ADAR Deaminases. *Annual Review of Biochemistry* **79**, 321–349.
- Nishizaki, T.** (2003). N-glycosylation sites on the nicotinic ACh receptor subunits regulate receptor channel desensitization and conductance. *Molecular Brain Research* **114**, 172–176.
- Niu, J., Yang, W.-J., Tian, Y., Fan, J.-Y., Ye, C., Shang, F., Ding, B.-Y., Zhang, J., An, X., Yang, L., et al.** (2019). Topical dsRNA delivery induces gene silencing and mortality in the pea aphid. *Pest Management Science* **75**, 2873–2881.
- Nooraie, S., Bahrololum, H., Hoseini, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J. et Ahmadian, G.** (2021). Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of Nanobiotechnology* **19**, 59.

- Oleskevich, S.** (1999). Cholinergic Synaptic Transmission in Insect Mushroom Bodies In Vitro. *Journal of Neurophysiology* **82**, 1091–1096.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., et al.** (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering, Design and Selection* **5**, 197–211.
- Olsen, R. W., Meunier, J.-C. et Changeux, J.-P.** (1972). Progress in the purification of the cholinergic receptor protein from *Electrophorus electricus* by affinity chromatography. *FEBS Letters* **28**, 96–100.
- Orr, N., Shaffner, A. J., Richey, K. et Crouse, G. D.** (2009). Novel mode of action of spinosad: Receptor binding studies demonstrating lack of interaction with known insecticidal target sites. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **95**, 1–5.

- P -

- Palli, S. R.** (2014). RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Current Opinion in Insect Science* **6**, 1–8.
- Pan, Y., Shang, Q., Fang, K., Zhang, J. et Xi, J.** (2010). Down-regulated transcriptional level of Ace1 combined with mutations in Ace1 and Ace2 of *Aphis gossypii* are related with omethoate resistance. *Chemico-Biological Interactions* **188**, 553–557.
- Papke, R. L.** (2014). Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* **89**, 1–11.
- Paulick, M. G. et Bertozzi, C. R.** (2008). The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins. *Biochemistry* **47**, 6991–7000.
- Pavlidis, N., Vontas, J. et Van Leeuwen, T.** (2018). The role of glutathione S-transferases (GSTs) in insecticide resistance in crop pests and disease vectors. *Current Opinion in Insect Science* **27**, 97–102.
- Perry, T., Chen, W., Ghazali, R., Yang, Y. T., Christesen, D., Martelli, F., Lumb, C., Bao Luong, H. N., Mitchell, J., Holien, J. K., et al.** (2021). Role of nicotinic acetylcholine receptor subunits in the mode of action of neonicotinoid, sulfoximine and spinosyn insecticides in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **131**, 103547.
- Pinheiro, D. H., Taylor, C. E., Wu, K. et Siegfried, B. D.** (2020). Delivery of gene-specific dsRNA by microinjection and feeding induces RNAi response in Sri Lanka weevil, *Myloecerus undecimpustulatus undatus* Marshall. *Pest Management Science* **76**, 936–943.
- Poupardin, R., Srisukontarat, W., Yunta, C. et Ranson, H.** (2014). Identification of Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **8**, e2743.
- Price, D. R. G. et Gatehouse, J. A.** (2008). RNAi-mediated crop protection against insects. *Trends in Biotechnology* **26**, 393–400.
- Pridgeon, J. W., Appel, A. G., Moar, W. J. et Liu, N.** (2002). Variability of resistance mechanisms in pyrethroid resistant German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **73**, 149–156.
- Pyakurel, P., Shin, M. et Venton, B. J.** (2018). Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) mediated dopamine release in larval *Drosophila melanogaster*. *Neurochemistry International* **114**, 33–41.

- Q -

- Qian, K., Guan, Q., Zhang, H., Zhang, N., Meng, X., Liu, H. et Wang, J.** (2022). RNAi-mediated knockdown of arginine kinase genes leads to high mortality and negatively affect reproduction and blood-feeding behavior of *Culex pipiens pallens*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **16**, e0010954.
- Qiao, J.-W., Fan, Y.-L., Wu, B.-J., Bai, T.-T., Wang, Y.-H., Zhang, Z.-F., Wang, D. et Liu, T.-X.** (2022). Downregulation of NADPH-cytochrome P450 reductase via RNA interference increases the susceptibility of *Acyrtosiphon pisum* to desiccation and insecticides. *Insect Science* **29**, 1105–1119.
- Qu, Y., Chen, J., Li, C., Wang, Q., Guo, W., Han, Z. et Jiang, W.** (2016). The subunit gene *Lda1* of nicotinic acetylcholine receptors plays important roles in the toxicity of imidacloprid and thiamethoxam against *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **127**, 51–58.
- Qu, X., Wang, S., Lin, G., Li, M., Shen, J. et Wang, D.** (2022). The Synergistic Effect of Thiamethoxam and Synapsin dsRNA Targets Neurotransmission to Induce Mortality in *Aphis gossypii*. *Int J Mol Sci* **23**, 9388.
- Quinn, D. M.** (1987). Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* **87**, 955–979.

- R -

- Rahayu, R., Melta, D. et . H.** (2022). Detection of Ace-1 Mutation in Temephos-Resistant *Aedes aegypti* L. in West Sumatra, Indonesia. *Pakistan J. of Biological Sciences* **25**, 816–821.
- Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. et Wang, X.** (2005). Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation. *Cell* **123**, 621–629.
- Rangasamy, M. et Siegfried, B. D.** (2012). Validation of RNA interference in western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae) adults. *Pest Management Science* **68**, 587–591.
- Raymond, V., B. Sattelle, D. et Lapied, B.** (2000). Co-existence in DUM neurones of two GluCl channels that differ in their picrotoxin sensitivity. *NeuroReport* **11**, 2695.
- Raymond, V., Goven, D., Benzidane, Y., List, O. et Lapied, B.** (2017). Influence of Cellular and Molecular Factors on Membrane Target Sensitivity to Insecticides. *Current Medicinal Chemistry* **24**, 2974–2987.
- Revah, F., Bertrand, D., Galzi, J.-L., Devillers-Thiéry, A., Mulle, C., Hussy, N., Bertrand, S., Ballivet, M. et Changeux, J.-P.** (1991). Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature* **353**, 846–849.
- Richards, S., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Brown, S. J., Denell, R., Beeman, R. W., Gibbs, R., Beeman, R. W., Brown, S. J., Bucher, G., et al.** (2008). The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature* **452**, 949–955.
- Rix, R. R. et Cutler, G. C.** (2018). Does multigenerational exposure to hormetic concentrations of imidacloprid precondition aphids for increased insecticide tolerance? *Pest Management Science* **74**, 314–322.
- Roat, T. C., Carvalho, S. M., Palma, M. S. et Malaspina, O.** (2017). Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil. *Environmental Toxicology and Chemistry* **36**, 1652–1660.

- Rocheleau, C. E.** (2012). RNA Interference: Systemic RNAi SIDes with Endosomes. *Current Biology* **22**, R873–R875.
- Rohrbough, J. et Broadie, K.** (2002). Electrophysiological Analysis of Synaptic Transmission in Central Neurons of *Drosophila* Larvae. *Journal of Neurophysiology* **88**, 847–860.
- Rosa, C., Kuo, Y.-W., Wuriyanghan, H. et Falk, B. W.** (2018). RNA Interference Mechanisms and Applications in Plant Pathology. *Annu. Rev. Phytopathol.* **56**, 581–610.
- Rosenberry, T. L.** (1975). Acetylcholinesterase. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, pp. 103–218. John Wiley & Sons, Ltd.

- S -

- Sadeghi, A., Van Damme, E. J. M. et Smagghe, G.** (2009). Evaluation of the susceptibility of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, to a selection of novel biorational insecticides using an artificial diet. *Journal of Insect Science* **9**, 65.
- Salgado, V. L.** (2016). Antagonist pharmacology of desensitizing and non-desensitizing nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *NeuroToxicology* **56**, 188–195.
- Salgado, V. L.** (2021). Selective actions of insecticides on desensitizing and non-desensitizing nicotinic acetylcholine receptors in cockroach (*Periplaneta americana*) neurons. *Pest Management Science* **77**, 3663–3672.
- Salgado, V. L. et Saar, R.** (2004). Desensitizing and non-desensitizing subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *Journal of Insect Physiology* **50**, 867–879.
- San Miguel, K. et Scott, J. G.** (2016). The next generation of insecticides: dsRNA is stable as a foliar-applied insecticide. *Pest Management Science* **72**, 801–809.
- Sánchez-Vargas, I., Scott, J. C., Poole-Smith, B. K., Franz, A. W. E., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., Olson, K. E. et Blair, C. D.** (2009). Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog* **5**, e1000299.
- Sapountzis, P., Dupont, G., Balmant, S., Gaget, K., Jaubert-Possamai, S., Febvay, G., Charles, H., Rahbé, Y., Colella, S. et Calevro, F.** (2014). New insight into the RNA interference response against cathepsin-L gene in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: Molting or gut phenotypes specifically induced by injection or feeding treatments. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **51**, 20–32.
- Saragoza, P. A., Modir, J. G., Goel, N., French, K. L., Li, L., Nowak, W. et Stitzel, J. A.** (2003). Identification of an alternatively processed nicotinic receptor $\alpha 7$ subunit RNA in mouse brain. *Molecular Brain Research*.
- Sato, K. et Siomi, M. C.** (2020). The piRNA pathway in *Drosophila* ovarian germ and somatic cells. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **96**, 32–42.
- Schubert, J., Beckmann, J., Hartmann, S., Morhenn, H.-G., Szalay, G., Heiss, C., Schnettler, R. et Lips, K. S.** (2012). Expression of the non-neuronal cholinergic system in human knee synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Life Sciences* **91**, 1048–1052.
- Schulz, R., Sawruk, E., Mülhardt, C., Bertrand, S., Baumann, A., Phannavong, B., Betz, H., Bertrand, D., Gundelfinger, E. D. et Schmitt, B.** (1998). Da3, a New Functional α Subunit of Nicotinic Acetylcholine Receptors from *Drosophila*. *Journal of Neurochemistry* **71**, 853–862.

- Selvam, V. et Srinivasan, S.** (2019). Neonicotinoid Poisoning and Management. *Indian J Crit Care Med* **23**, S260–S262.
- Seong, K. M., Kim, Y. H., Kwon, D. H. et Lee, S. H.** (2012). Identification and characterization of three cholinesterases from the common bed bug, *Cimex lectularius*. *Insect Molecular Biology* **21**, 149–159.
- Sgard, F., Fraser, S. P., Katkowska, M. J., Djamgoz, M. B. A., Dunbar, S. J. et Windass, J. D.** (1998). Cloning and Functional Characterisation of Two Novel Nicotinic Acetylcholine Receptor α Subunits from the Insect Pest *Myzus persicae*. *Journal of Neurochemistry* **71**, 903–912.
- Shahsavari, A., Gajhede, M., Kastrup, J. S. et Balle, T.** (2016). Structural Studies of Nicotinic Acetylcholine Receptors: Using Acetylcholine-Binding Protein as a Structural Surrogate. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **118**, 399–407.
- Shan, T., Zhang, H., Chen, C., Chen, A., Shi, X. et Gao, X.** (2020). Low expression levels of nicotinic acetylcholine receptor subunits $\text{Bo}\alpha 1$ and $\text{Bo}\beta 1$ are associated with imidacloprid resistance in *Bradysia odoriphaga*. *Pest Management Science* **76**, 3038–3045.
- Shang, Q., Pan, Y., Fang, K., Xi, J., Wong, A., Brennan, J. A. et Cao, C.** (2014). Extensive *Ace2* duplication and multiple mutations on *Ace1* and *Ace2* are related with high level of organophosphates resistance in *Aphis gossypii*. *Environmental Toxicology* **29**, 526–533.
- Shao, Y.-M., Dong, K. et Zhang, C.-X.** (2007). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* **8**, 324.
- Sharath Chandra, G., Asokan, R., Manamohan, M. et Krishna Kumar, N.** (2019). Enhancing RNAi by using concatemeric double-stranded RNA. *Pest Management Science* **75**, 506–514.
- Shi, M., Yue, Z., Kuryatov, A., Lindstrom, J. M. et Sehgal, A.** (2014). Identification of Redeye, a new sleep-regulating protein whose expression is modulated by sleep amount. *eLife* **3**, e01473.
- Shi, T.-F., Wang, Y.-F., Liu, F., Qi, L. et Yu, L.-S.** (2017). Sublethal Effects of the Neonicotinoid Insecticide Thiamethoxam on the Transcriptome of the Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* **110**, 2283–2289.
- Shih, J. D. et Hunter, C. P.** (2011). SID-1 is a dsRNA-selective dsRNA-gated channel. *RNA* **17**, 1057–1065.
- Shimomura, M., Okuda, H., Matsuda, K., Komai, K., Akamatsu, M. et Sattelle, D. B.** (2002). Effects of mutations of a glutamine residue in loop D of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor on agonist profiles for neonicotinoid insecticides and related ligands. *British Journal of Pharmacology* **137**, 162–169.
- Shimomura, M., Yokota, M., Matsuda, K., Sattelle, D. B. et Komai, K.** (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**, 195–198.
- Shimomura, M., Yokota, M., Ihara, M., Akamatsu, M., Sattelle, D. B. et Matsuda, K.** (2006). Role in the Selectivity of Neonicotinoids of Insect-Specific Basic Residues in Loop D of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist Binding Site. *Mol Pharmacol* **70**, 1255–1263.
- Silva, A. P. B., Santos, J. M. M. et Martins, A. J.** (2014). Mutations in the voltage-gated sodium channel gene of anophelines and their association with resistance to pyrethroids – a review. *Parasites & Vectors* **7**, 450.
- Silver, K., Cooper, A. M. et Zhu, K. Y.** (2021). Strategies for enhancing the efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science* **77**, 2645–2658.
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., et al.** (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environ Sci Pollut Res* **22**, 5–34.

- Sinakevitch, I.** (1995). Détermination de la nature chimique du produit synthétisé et libéré par les dorsal unpaired median (DUM) neurones et étude du rôle physiologique de ces cellules neurosécrétrices du 6ème ganglion abdominal de la blatte *periplaneta americana* L.
- Sinakevitch, I. g., Geffard, M., Pelhate, M. et Lapied, B.** (1996). Anatomy and targets of dorsal unpaired median neurones in the terminal abdominal ganglion of the male cockroach *Periplaneta americana* L. *Journal of Comparative Neurology* **367**, 147–163.
- Sine, S. M. et Engel, A. G.** (2006). Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* **440**, 448–455.
- Sinkus, M. L., Graw, S., Freedman, R., Ross, R. G., Lester, H. A. et Leonard, S.** (2015). The human CHRNA7 and CHRFA7A genes: A review of the genetics, regulation, and function. *Neuropharmacology* **96**, 274–288.
- Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. et Aravin, A. A.** (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 246–258.
- Smit, A. B., Syed, N. I., Schaap, D., van Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K. S., Lodder, H., van der Schors, R. C., van Elk, R., Sorgedraeger, B., et al.** (2001). A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* **411**, 261–268.
- Smith, A. E. et Secoy, D. M.** (1975). Forerunners of pesticides in classical Greece and Rome. *J. Agric. Food Chem.* **23**, 1050–1055.
- Somers, J., Luong, H. N. B., Mitchell, J., Batterham, P. et Perry, T.** (2017). Pleiotropic Effects of Loss of the Dα1 Subunit in *Drosophila melanogaster*: Implications for Insecticide Resistance. *Genetics* **205**, 263–271.
- Song, H., Fan, Y., Zhang, J., Cooper, A. M., Silver, K., Li, D., Li, T., Ma, E., Zhu, K. Y. et Zhang, J.** (2019). Contributions of dsRNases to differential RNAi efficiencies between the injection and oral delivery of dsRNA in *Locusta migratoria*. *Pest Management Science* **75**, 1707–1717.
- Soreq, H. et Seidman, S.** (2001). Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* **2**, 294–302.
- Sparks, T. C., Wessels, F. J., Lorsbach, B. A., Nugent, B. M. et Watson, G. B.** (2019). The new age of insecticide discovery—the crop protection industry and the impact of natural products. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **161**, 12–22.
- Sparks, T. C., Storer, N., Porter, A., Slater, R. et Nauen, R.** (2021). Insecticide resistance management and industry: the origins and evolution of the Insecticide Resistance Action Committee (IRAC) and the mode of action classification scheme. *Pest Manag Sci* **77**, 2609–2619.
- Srivastava, S., Ahmad, R. et Khare, S. K.** (2021). Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* **216**, 113320.
- Stankiewicz, M., Dąbrowski, M. et de Lima, M. E.** (2012). Nervous System of *Periplaneta americana* Cockroach as a Model in Toxicological Studies: A Short Historical and Actual View. *Journal of Toxicology* **2012**, e143740.
- Steinhauer, N., Kulhanek, K., Antúnez, K., Human, H., Chantawannakul, P., Chauzat, M.-P. et vanEngelsdorp, D.** (2018). Drivers of colony losses. *Current Opinion in Insect Science* **26**, 142–148.
- Stougaard, P., Molin, S. et Nordström, K.** (1981). RNAs involved in copy-number control and incompatibility of plasmid R1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6008–6012.
- Su, H. et O'Dowd, D. K.** (2003). Fast Synaptic Currents in *Drosophila* Mushroom Body Kenyon Cells Are Mediated by α -Bungarotoxin-Sensitive Nicotinic Acetylcholine Receptors and Picrotoxin-Sensitive GABA Receptors. *J. Neurosci.* **23**, 9246–9253.

- Suchail, S., Debrauwer, L. et Belzunces, L. P.** (2004). Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest Management Science* **60**, 291–296.
- Sumikawa, K. et Gehle, V. M.** (1992). Assembly of mutant subunits of the nicotinic acetylcholine receptor lacking the conserved disulfide loop structure. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 6286–6290.
- Sun, H., Liu, Y., Li, J., Cang, X., Bao, H. et Liu, Z.** (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**, 32–40.
- Sun, Y., Wang, P., Abouzaid, M., Zhou, H., Liu, H., Yang, P., Lin, Y., Hull, J. J. et Ma, W.** (2020). Nanomaterial-wrapped dsCYP15C1, a potential RNAi-based strategy for pest control against *Chilo suppressalis*. *Pest Management Science* **76**, 2483–2489.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolov, F., Varon, L., Toker, L., Futerman, A. H. et Silman, I.** (1988). Purification and crystallization of a dimeric form of acetylcholinesterase from *Torpedo californica* subsequent to solubilization with phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Journal of Molecular Biology* **203**, 821–823.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolov, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. et Silman, I.** (1991). Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A Prototypic Acetylcholine-Binding Protein. *Science* **253**, 872–879.
- Suzuki, T., Nunes, M. A., España, M. U., Namin, H. H., Jin, P., Bensoussan, N., Zhurov, V., Rahman, T., Clercq, R. D., Hilson, P., et al.** (2017). RNAi-based reverse genetics in the chelicerate model *Tetranychus urticae*: A comparative analysis of five methods for gene silencing. *PLOS ONE* **12**, e0180654.
- T -
- Tafesh-Edwards, G. et Eleftherianos, I.** (2020). *Drosophila* immunity against natural and nonnatural viral pathogens. *Virology* **540**, 165–171.
- Taguchi, R., Suzuki, K., Nakabayashi, T. et Ikezawa, H.** (1984). Acetylcholinesterase Release from Mammalian Erythrocytes by Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C of *Bacillus thuringiensis* and Characterization of the Released Enzyme 1. *The Journal of Biochemistry* **96**, 437–446.
- Taillebois, E. et Thany, S. H.** (2016). Characterization of nicotin acetylcholine receptor subunits in the cockroach *Periplaneta americana* mushroom bodies reveals a strong expression of β 1 subunit: involvement in nicotine-induced currents. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **93**, 40–54.
- Taillebois, E., Heuland, E., Bourdin, C. M., Griveau, A., Quinchard, S., Tricoire-Leignel, H., Legros, C. et Thany, S. H.** (2013). Ca^{2+} /CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE II IN THE COCKROACH *Periplaneta americana*: IDENTIFICATION OF FIVE ISOFORMS AND THEIR TISSUES DISTRIBUTION. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **83**, 138–150.
- Takayama, K., Ito, R., Yamamoto, H., Otsubo, S., Matsumoto, R., Ojima, H., Komori, Y., Matsuda, K. et Ihara, M.** (2022). Effects of cofactors RIC-3, TMX3 and UNC-50, together with distinct subunit ratios on the agonist actions of imidacloprid on *Drosophila melanogaster* D α 1/D β 1 nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **187**, 105177.
- Talesa, V. N.** (2001). Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* **122**, 1961–1969.

- Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P. et Changeux, J.-P.** (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 733–750.
- Tan, J., Galligan, J. J. et Hollingworth, R. M.** (2007). Agonist actions of neonicotinoids on nicotinic acetylcholine receptors expressed by cockroach neurons. *NeuroToxicology* **28**, 829–842.
- Tan, Y., Ma, Y., Jia, B., Homem, R. A., Williamson, M. S., Gao, S.-J., Han, H.-B., Xiang, K.-F., Sun, X.-T., Gao, X., et al.** (2021). Laboratory Selection, Cross-Resistance, Risk Assessment to Lambda-Cyhalothrin Resistance, and Monitoring of Insecticide Resistance for Plant Bug *Lygus pratensis* (Hemiptera: Miridae) in Farming-Pastoral Ecotones of Northern China. *Journal of Economic Entomology* **114**, 891–902.
- Taning, C. N. T., Christiaens, O., Berkvens, N., Casteels, H., Maes, M. et Smagghe, G.** (2016). Oral RNAi to control *Drosophila suzukii*: laboratory testing against larval and adult stages. *J Pest Sci* **89**, 803–814.
- Taning, C. N. T., Christiaens, O., Li, X., Swevers, L., Casteels, H., Maes, M. et Smagghe, G.** (2018). Engineered Flock House Virus for Targeted Gene Suppression Through RNAi in Fruit Flies (*Drosophila melanogaster*) in Vitro and in Vivo. *Frontiers in Physiology* **9**.
- Tasman, K., Hidalgo, S., Zhu, B., Rands, S. A. et Hodge, J. J. L.** (2021). Neonicotinoids disrupt memory, circadian behaviour and sleep. *Sci Rep* **11**, 2061.
- Thany, S. H.** (2009). Agonist actions of clothianidin on synaptic and extrasynaptic nicotinic acetylcholine receptors expressed on cockroach sixth abdominal ganglion. *NeuroToxicology* **30**, 1045–1052.
- Thany, S. H. et Tricoire-Leignel, H.** (2011). Emerging Pharmacological Properties of Cholinergic Synaptic Transmission: Comparison between Mammalian and Insect Synaptic and Extrasynaptic Nicotinic Receptors. *Current Neuropharmacology* **9**, 706–714.
- Thany, S. H., Lenaers, G., Raymond-Delpech, V., Sattelle, D. B. et Lapied, B.** (2007). Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **28**, 14–22.
- Thany, S. H., Courjaret, R. et Lapied, B.** (2008). Effect of calcium on nicotine-induced current expressed by an atypical α -bungarotoxin-insensitive nAChR2. *Neuroscience Letters* **438**, 317–321.
- Thapa, S., Lv, M. et Xu, H.** (2017). Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **17**, 1665–1676.
- The International Aphid Genomics Consortium** (2010). Genome Sequence of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLOS Biology* **8**, e1000313.
- Tomizawa, J., Itoh, T., Selzer, G. et Som, T.** (1981). Inhibition of ColE1 RNA primer formation by a plasmid-specified small RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 1421–1425.
- Tomoyasu, Y., Miller, S. C., Tomita, S., Schoppmeier, M., Grossmann, D. et Bucher, G.** (2008). Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in *Tribolium*. *Genome Biology* **9**, R10.
- Tong, F., Gross, A. D., Dolan, M. C. et Coats, J. R.** (2013). The phenolic monoterpene carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor. *Pest Management Science* **69**, 775–780.
- Toshima, K., Kanaoka, S., Yamada, A., Tarumoto, K., Akamatsu, M., Sattelle, D. B. et Matsuda, K.** (2009). Combined roles of loops C and D in the interactions of a neonicotinoid insecticide imidacloprid with the α 4 β 2 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* **56**, 264–272.

Troczka, B. J., Singh, K. S., Zimmer, C. T., Vontas, J., Nauen, R., Hayward, A. et Bass, C. (2021). Molecular innovations underlying resistance to nicotine and neonicotinoids in the aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science* **77**, 5311–5320.

- U -

Ulvila, J., Parikka, M., Kleino, A., Sormunen, R., Ezekowitz, R. A., Kocks, C. et Rämetsä, M. (2006). Double-stranded RNA Is Internalized by Scavenger Receptor-mediated Endocytosis in *Drosophila* S2 Cells. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 14370–14375.

Unwin, N. (2005). Refined Structure of the Nicotinic Acetylcholine Receptor at 4Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **346**, 967–989.

Unwin, N. (2013). Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: insights from *Torpedo* postsynaptic membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* **46**, 283–322.

Unwin, N. (2022). Structure of a cholinergic cell membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, e2207641119.

Unwin, N. et Fujiyoshi, Y. (2012). Gating Movement of Acetylcholine Receptor Caught by Plunge-Freezing. *Journal of Molecular Biology* **422**, 617–634.

- V -

Valdes, V. J., Athie, A., Salinas, L. S., Navarro, R. E. et Vaca, L. (2012). CUP-1 Is a Novel Protein Involved in Dietary Cholesterol Uptake in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS ONE* **7**, e33962.

Vale, A. et Lotti, M. (2015). Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. In *Handbook of Clinical Neurology* (ed. Lotti, M.) and Bleeker, M. L.), pp. 149–168. Elsevier.

van Dijk, M., Morley, T., Rau, M. L. et Saghai, Y. (2021). A meta-analysis of projected global food demand and population at risk of hunger for the period 2010–2050. *Nat Food* **2**, 494–501.

van Rij, R. P. van, Saleh, M.-C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C. et Andino, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **20**, 2985–2995.

Vélez, A. M. et Fishilevich, E. (2018). The mysteries of insect RNAi: A focus on dsRNA uptake and transport. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **151**, 25–31.

Vo, D. T., Hsu, W. H., Abu-Basha, E. A. et Martin, R. J. (2010). Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **33**, 315–322.

Vryzas, Z. (2018). Pesticide fate in soil-sediment-water environment in relation to contamination preventing actions. *Current Opinion in Environmental Science & Health* **4**, 5–9.

- W -

- Wang, L., Feng, Y. et Denburg, J. L.** (1992). A multifunctional cell surface developmental stage-specific antigen in the cockroach embryo: involvement in pathfinding by CNS pioneer axons. *Journal of Cell Biology* **118**, 163–176.
- Wang, X.-H., Aliyari, R., Li, W.-X., Li, H.-W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P. et Ding, S.-W.** (2006). RNA Interference Directs Innate Immunity Against Viruses in Adult *Drosophila*. *Science* **312**, 452–454.
- Wang, H., Gong, L., Qi, J., Hu, M., Zhong, G. et Gong, L.** (2014). Molecular cloning and characterization of a SID-1-like gene in *Plutella xylostella*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **87**, 164–176.
- Wang, X., Meng, X., Liu, C., Gao, H., Zhang, Y. et Liu, Z.** (2015). Cys-loop ligand-gated ion channel gene discovery in the *Locusta migratoria manilensis* through the neuron transcriptome. *Gene* **561**, 276–282.
- Wang, K., Zhang, M., Huang, Y., Yang, Z., Su, S. et Chen, M.** (2018). Characterisation of imidacloprid resistance in the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*, a serious pest on wheat crops. *Pest Management Science* **74**, 1457–1465.
- Wang, K., Peng, Y., Chen, J., Peng, Y., Wang, X., Shen, Z. et Han, Z.** (2020). Comparison of efficacy of RNAi mediated by various nanoparticles in the rice striped stem borer (*Chilo suppressalis*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **165**, 104467.
- Wang, Z.-J., Liang, C.-R., Shang, Z.-Y., Yu, Q.-T. et Xue, C.-B.** (2021). Insecticide resistance and resistance mechanisms in the melon aphid, *Aphis gossypii*, in Shandong, China. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **172**, 104768.
- Wang, Z.-M., Li, S., Shi, C.-C., Xie, L.-J., Fu, K.-Y. et Jiang, W.-H.** (2022). The actions of neonicotinoid insecticides on nicotinic acetylcholine subunits Lda1 and Lda8 of *Leptinotarsa decemlineata* and assembled receptors. *Insect Science* **29**, 1387–1400.
- Watson, G. B., Siebert, M. W., Wang, N. X., Loso, M. R. et Sparks, T. C.** (2021). Sulfoxaflor – A sulfoximine insecticide: Review and analysis of mode of action, resistance and cross-resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **178**, 104924.
- Wegener, C., Hamasaka, Y. et Nässel, D. R.** (2004). Acetylcholine Increases Intracellular Ca²⁺ Via Nicotinic Receptors in Cultured PDF-Containing Clock Neurons of *Drosophila*. *Journal of Neurophysiology* **91**, 912–923.
- Wei, X., Pan, Y., Xin, X., Zheng, C., Gao, X., Xi, J. et Shang, Q.** (2017). Cross-resistance pattern and basis of resistance in a thiamethoxam-resistant strain of *Aphis gossypii* Glover. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **138**, 91–96.
- Weill, M., Fort, P., Berthomieu, A., Dubois, M. P., Pasteur, N. et Raymond, M.** (2002). A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **269**, 2007–2016.
- Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M. et Raymond, M.** (2004). The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology* **13**, 1–7.
- Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Weinstock, G. M., Robinson, G. E., Worley, K. C., Evans, J. D., Maleszka, R., Robertson, H. M., et al.** (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**, 931–949.
- Welker, N. C., Maity, T. S., Ye, X., Aruscavage, P. J., Krauchuk, A. A., Liu, Q. et Bass, B. L.** (2011). Dicer's Helicase Domain Discriminates dsRNA Termini to Promote an Altered Reaction Mode. *Molecular Cell* **41**, 589–599.
- Wessler, I. et Kirkpatrick, C. J.** (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology* **154**, 1558–1571.

- Whyard, S., Singh, A. D. et Wong, S.** (2009). Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**, 824–832.
- Williamson, S. M. et Wright, G. A.** (2013). Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. *Journal of Experimental Biology* **216**, 1799–1807.
- Williamson, S. M., Walsh, T. K. et Wolstenholme, A. J.** (2007). The cys-loop ligand-gated ion channel gene family of *Brugia malayi* and *Trichinella spiralis*: a comparison with *Caenorhabditis elegans*. *Invert Neurosci* **7**, 219–226.
- Windley, M. J., Vetter, I., Lewis, R. J. et Nicholson, G. M.** (2017). Lethal effects of an insecticidal spider venom peptide involve positive allosteric modulation of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **127**, 224–242.
- Winston, W. M., Molodowitch, C. et Hunter, C. P.** (2002). Systemic RNAi in *C. elegans* Requires the Putative Transmembrane Protein SID-1. *Science* **295**, 2456–2459.
- Winston, W. M., Sutherlin, M., Wright, A. J., Feinberg, E. H. et Hunter, C. P.** (2007). *Caenorhabditis elegans* SID-2 is required for environmental RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 10565–10570.
- Wu, M., Robinson, J. E. et Joiner, W. J.** (2014). SLEEPLESS Is a Bifunctional Regulator of Excitability and Cholinergic Synaptic Transmission. *Current Biology* **24**, 621–629.
- Wu, Z., Cheng, H., Jiang, Y., Melcher, K. et Xu, H. E.** (2015). Ion channels gated by acetylcholine and serotonin: structures, biology, and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* **36**, 895–907.
- Wuriyanghan, H. et Falk, B. W.** (2013). RNA Interference towards the Potato Psyllid, *Bactericera cockerelli*, Is Induced in Plants Infected with Recombinant Tobacco mosaic virus (TMV). *PLOS ONE* **8**, e66050.
- Wüstenberg, D. G. et Grünewald, B.** (2004). Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A* **190**, 807–821.
- Wynant, N., Verlinden, H., Breugelmans, B., Simonet, G. et Vanden Broeck, J.** (2012). Tissue-dependence and sensitivity of the systemic RNA interference response in the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **42**, 911–917.
- Wynant, N., Santos, D. et Vanden Broeck, J.** (2014). Biological Mechanisms Determining the Success of RNA Interference in Insects. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (ed. Jeon, K. W.), pp. 139–167. Academic Press.

- X -

- Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C., Cheng, D., Dai, F., Li, B., Zhao, P., Zha, X., Cheng, T., Chai, C., et al.** (2004). A Draft Sequence for the Genome of the Domesticated Silkworm (*Bombyx mori*). *Science* **306**, 1937–1940.
- Xie, J., Li, S., Zhang, W. et Xia, Y.** (2019). RNAi-knockdown of the *Locusta migratoria* nuclear export factor protein results in insect mortality and alterations in gut microbiome. *Pest Management Science* **75**, 1383–1390.
- Xu, J. et Cherry, S.** (2014). Viruses and Antiviral Immunity in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol* **42**, 10.1016/j.dci.2013.05.002.
- Xu, W. et Han, Z.** (2008). Cloning and phylogenetic analysis of sid-1-like genes from aphids. *Journal of Insect Science* **8**, 30.

- Xu, Q., Liu, H., Zhang, L. et Liu, N.** (2005). Resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, and possible mechanisms for resistance. *Pest Management Science* **61**, 1096–1102.
- Xu, H.-J., Chen, T., Ma, X.-F., Xue, J., Pan, P.-L., Zhang, X.-C., Cheng, J.-A. et Zhang, C.-X.** (2013). Genome-wide screening for components of small interfering RNA (siRNA) and micro-RNA (miRNA) pathways in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Molecular Biology* **22**, 635–647.
- Xu, X., Ding, Q., Wang, X., Wang, R., Ullah, F., Gao, X. et Song, D.** (2022). V101I and R81T mutations in the nicotinic acetylcholine receptor β 1 subunit are associated with neonicotinoid resistance in *Myzus persicae*. *Pest Management Science* **78**, 1500–1507.
- Xue, Q., Swevers, L. et Taning, C. N. T.** (2023). Plant and insect virus-like particles: emerging nanoparticles for agricultural pest management. *Pest Management Science* **n/a**.

- Y -

- Yan, S., Ren, B.-Y. et Shen, J.** (2021). Nanoparticle-mediated double-stranded RNA delivery system: A promising approach for sustainable pest management. *Insect Science* **28**, 21–34.
- Yang, T. et Liu, N.** (2011). Genome Analysis of Cytochrome P450s and Their Expression Profiles in Insecticide Resistant Mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*. *PLOS ONE* **6**, e29418.
- Yang, B., Yao, X., Gu, S., Zhang, Y., Liu, Z. et Zhang, Y.** (2010). Selectivity of lynx proteins on insect nicotinic acetylcholine receptors in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology* **19**, 283–289.
- Yang, X., He, C., Xie, W., Liu, Y., Xia, J., Yang, Z., Guo, L., Wen, Y., Wang, S., Wu, Q., 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**, 73–78.
- Yang, X., Xie, W., Li, R., Zhou, X., Wang, S., Wu, Q., Yang, N., Xia, J., Yang, Z., Guo, L., et al.** (2017). RNA interference-mediated knockdown of the hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase gene decreases thiamethoxam resistance in adults of the whitefly *Bemisia tabaci*. *Sci Rep* **7**, 41201.
- Yang, Q., De Schutter, K., Chen, P., Van Damme, E. J. M. et Smaghe, G.** (2022). RNAi of the N-glycosylation-related genes confirms their importance in insect development and α -1,6-fucosyltransferase plays a role in the ecdysis event for the hemimetabolous pest insect *Nilaparvata lugens*. *Insect Science* **29**, 91–99.
- Yao, Y., Lin, D.-J., Cai, X.-Y., Wang, R., Hou, Y.-M., Hu, C.-H., Gao, S.-J. et Wang, J.-D.** (2022). Multiple dsRNases Involved in Exogenous dsRNA Degradation of Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Frontiers in Physiology* **13**,
- Ye, X., Yang, L., Stanley, D., Li, F. et Fang, Q.** (2017). Two *Bombyx mori* acetylcholinesterase genes influence motor control and development in different ways. *Sci Rep* **7**, 4985.
- Ye, C., Hu, X.-S., Wang, Z.-W., Wei, D., Smaghe, G., Christiaens, O., Niu, J. et Wang, J.-J.** (2021). Involvement of clathrin-dependent endocytosis in cellular dsRNA uptake in aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **132**, 103557.
- Ye, C., An, X., Xie, B.-Q., Ding, B.-Y., Niu, J. et Wang, J.-J.** (2022). The involvement of systemic RNA interference deficient-1-like (SIL1) in cellular dsRNA uptake in *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Science* **n/a**.

Yu, R., Liu, W., Li, D., Zhao, X., Ding, G., Zhang, M., Ma, E., Zhu, K., Li, S., Moussian, B., et al. (2016). Helicoidal Organization of Chitin in the Cuticle of the Migratory Locust Requires the Function of the Chitin Deacetylase2 Enzyme (LmCDA2). *Journal of Biological Chemistry* **291**, 24352–24363.

Yu, H., Yi, L. et Lu, Z. (2022). Silencing of Chitin-Binding Protein with PYPV-Rich Domain Impairs Cuticle and Wing Development in the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri*. *Insects* **13**, 353.

- Z -

Zewen, L., Zhaojun, H., Yinchang, W., Lingchun, Z., Hongwei, Z. et Chengjun, L. (2003). Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: cross-resistance patterns and possible mechanisms. *Pest Management Science* **59**, 1355–1359.

Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. et Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**, 57–68.

Zhang, X., Zhang, J. et Zhu, K. Y. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology* **19**, 683–693.

Zhang, H., Li, H., Guan, R. et Miao, X. (2015a). Lepidopteran insect species-specific, broad-spectrum, and systemic RNA interference by spraying dsRNA on larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **155**, 218–228.

Zhang, Y., Wang, X., Yang, B., Hu, Y., Huang, L., Bass, C. et Liu, Z. (2015b). Reduction in mRNA and protein expression of a nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 8$ subunit is associated with resistance to imidacloprid in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *J. Neurochem.* **135**, 686–694.

Zhang, Y., Yang, Y., Sun, H. et Liu, Z. (2016). Metabolic imidacloprid resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, relies on multiple P450 enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **79**, 50–56.

Zhang, Y., Yang, B., Li, J., Liu, M. et Liu, Z. (2017). Point mutations in acetylcholinesterase 1 associated with chlorpyrifos resistance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. *Insect Molecular Biology* **26**, 453–460.

Zhou, R., Hotta, I., Denli, A. M., Hong, P., Perrimon, N. et Hannon, G. J. (2008). Comparative Analysis of Argonaute-dependent Small RNA Pathways in *Drosophila*. *Mol Cell* **32**, 592–599.

Zhu, F. et Liu, N. (2008). Differential expression of CYP6A5 and CYP6A5v2 in pyrethroid-resistant house flies, *Musca domestica*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **67**, 107–119.

Zhu, K. Y. et Palli, S. R. (2020). Mechanisms, Applications, and Challenges of Insect RNA Interference. *Annual Review of Entomology* **65**, 293–311.

Zhu, F., Feng, J.-N., Zhang, L. et Liu, N. (2008a). Characterization of two novel cytochrome P450 genes in insecticide-resistant house-flies. *Insect Molecular Biology* **17**, 27–37.

Zhu, F., Li, T., Zhang, L. et Liu, N. (2008b). Co-up-regulation of three P450 genes in response to permethrin exposure in permethrin resistant house flies, *Musca domestica*. *BMC Physiology* **8**, 18.

Zimmerman, G. et Soreq, H. (2006). Readthrough acetylcholinesterase: A Multifaceted Inducer of Stress Reactions. *J Mol Neurosci* **30**, 197–200.

Zografidis, A., Van Nieuwerburgh, F., Koliopoulou, A., Apostolou-Karampelis, K., Head, S. R., Deforce, D., Smaghe, G. et Swevers, L. (2015). Viral Small-RNA Analysis of *Bombyx mori* Larval

Midgut during Persistent and Pathogenic Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Infection. *J Virol* **89**, 11473–11486.

Zoh, M. G., Tutagata, J., Fodjo, B. K., Mouhamadou, C. S., Sadia, C. G., McBeath, J., Schmitt, F., Horstmann, S., David, J.-P. et Reynaud, S. (2022). Exposure of *Anopheles gambiae* larvae to a sub-lethal dose of an agrochemical mixture induces tolerance to adulticides used in vector control management. *Aquatic Toxicology* **248**, 106181.

Zoli, M., Pistillo, F. et Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* **96**, 302–311.

Zuhorn, I. S., Engberts, J. B. F. N. et Hoekstra, D. (2007). Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. *Eur Biophys J* **36**, 349–362.

Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une synapse cholinergique et des différents éléments cellulaires et moléculaires impliqués dans la transmission rapide de l'influx nerveux.	14
Figure 2 : Photographie d'un nAChR.....	16
Figure 3 : Structure générale d'un nAChR.....	17
Figure 4 : Structure d'une sous-unité nicotinique.....	19
Figure 5 : Représentation schématique d'un nAChR et d'un site de fixation de l'ACh.....	20
Figure 6 : Structure du pore ionique d'un nAChR.....	21
Figure 7 : Dynamique structurale des nAChRs.....	22
Figure 8 : Effet potentialisateur de la réponse à l'ACh de la spinosyne A sur les nAChRs de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	37
Figure 9 : Représentation des voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la régulation des nAChRs d'insecte.....	39
Figure 10 : : Représentation schématique de la régulation du nAChR1 des neurones DUM de la blatte <i>Periplaneta americana</i> par la voie de signalisation intracellulaire impliquant les PKC1 et PKC2 proposée par Courjaret <i>et al.</i> , 2003.....	40
Figure 11 : Représentation schématique de la régulation des nAChRs sensibles et insensibles à l' α -bgt des neurones DUM de la blatte <i>Periplaneta americana</i> impliquant le Ca^{2+} et la CaMKII-E ainsi que la voie AMPc/PKA proposée par List <i>et al.</i> , 2014.....	42
Figure 12 : Représentation schématique de la régulation des nAChRs des neurones DUM de la blatte <i>Periplaneta americana</i> impliquant la voie GMPc/PKG proposée par Mannai <i>et al.</i> , 2016.....	43
Figure 13 : Structure générale de l'AChE.....	47
Figure 14 : Représentation schématique de la dégradation de l'ACh par l'AChE dans la synapse cholinergique.....	49
Figure 15 : L'AChE principale chez les insectes.....	51
Figure 16 : Représentation graphique du nombre cumulé de cas de résistance à un insecticide associé à la date d'introduction sur le marché de certaines classes majeures d'insecticides.....	54

Figure 17 : Structure chimique des insecticides néonicotinoïdes	56
Figure 18 : Interaction entre l'imidaclopride (IMI) et le site orthostérique d'un nAChR d'insecte	60
Figure 19 : Interaction entre l'imidaclopride (IMI) et la boucle G des sites orthostériques des nAChRs d'insectes.....	61
Figure 20 : Structure chimique des insecticides carbamates et organophosphorés	62
Figure 21 : Mode d'action des insecticides carbamates et organophosphorés	63
Figure 22 : Représentation schématique des principaux mécanismes de résistances aux insecticides	65
Figure 23 : Représentation schématique du mécanisme de détoxification des xénobiotiques comme les insecticides	66
Figure 24 : Représentation schématique des phénomènes d'accommodation aux insecticides après une exposition à une dose sub létale d'insecticide et des principaux mécanismes sous-jacents.....	71
Figure 25 : Représentation schématique des différents voies d'interférence ARN chez l'insecte	74
Figure 26 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans l'absorption cellulaire des dsRNAs exogènes chez l'insecte	76
Figure 27 : Structure de l'enzyme Dicer 2 de la mouche <i>Drosophila melanogaster</i> (Dm-Dcr2).....	78
Figure 28 : Structure de l'enzyme Argonaute 2 de la mouche <i>Drosophila melanogaster</i> (Dm-Ago2).....	80
Figure 29 : Exemples de nanoparticules étudiées et envisagées pour encapsuler les dsRNAs et augmenter leur efficacité dans la lutte contre les insectes nuisibles.....	83
Figure 30 : Représentation schématique du cycle de reproduction du puceron du pois <i>Acyrtosiphon pisum</i> ..	93
Figure 31 : Photographie de pucerons du pois <i>Acyrtosiphon pisum</i> aux stades larvaire et adulte	94
Figure 32 : Le système artificiel de nutrition	94
Figure 33 : Photographies représentant les différents stades de développement de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	97
Figure 34 : Photographies illustrant le dimorphisme sexuel de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	98
Figure 35 : Les neurones DUM de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	99
Figure 36 : Représentation schématique du principe de dosage de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase selon la méthode d'Ellman	110
Figure 37 : Principe de la technique d'imagerie calcique	114
Figure 38 : Quantification par qPCR de l'expression des transcrits de l'AChE1 des pucerons <i>Acyrtosiphon pisum</i> traités avec les dsRNAs d'intérêts (dsRNA-LacZ ou dsRNA-ApisumAChE1) à 2h, 24h et 48h	134

Figure 39 : Effet des dsRNA- <i>ApisumAChE1</i> sur l'activité enzymatique de l'AChE	135
Figure 40 : Evaluation de l'utilisation des dsRNA- <i>ApisumAChE1</i> comme bioinsecticide	136
Figure 41 : Courbes de mortalité des larves de puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i> obtenues après des expériences d'intoxication aiguë au pirimicarbe à une concentration comprise entre 10^{-9} M et 10^{-4} M	137
Figure 42 : Quantification par qPCR de l'expression des transcrits de la sous-unité nicotinique Pamea7 dans les DGA provenant de blattes <i>Periplaneta americana</i> 96h après l'ingestion des dsRNAs d'intérêt (dsRNA-LacZ ou dsRNA-Pamea7)	165
Figure 43 : Histogrammes représentant le pourcentage de mortalité des blattes ayant ingéré les dsRNAs d'intérêt (dsRNA-LacZ ou dsRNA-Pamea7) à 24h, 48h, 72h et 96h après l'intoxication aiguë à l'imidaclopride à une dose de 2,5µg/blatte.....	166
Figure 44 : Quantification par qPCR de l'expression des transcrits des sous-unités nicotiniques Pamea1, Pamea2, Pamea3, Pamea4, Pamea6, Pamea8, Pamea9 et Pameβ1 dans les DGAs issus de blattes <i>Periplaneta americana</i> ayant ingéré les dsRNA-Pamea7 ou les dsRNA-LacZ 96h auparavant	167
Figure 45 : Exemple de tracé représentant la variation du ratio 340nm/380nm au cours du temps après un prétraitement de CoCl_2 à 3.10^{-3} M, puis une application de NIC à 10^{-5} M sur les neurones DUM	168
Figure 46 : Effet de l' α -bungarotoxine (α -bgt) sur la réponse calcique des nAChRs des neurones DUM de la blatte <i>Periplaneta americana</i>	169
Figure 47 : Histogramme représentant la variation moyenne du ratio 340nm/380nm après un prétraitement avec du CoCl_2 à 3.10^{-3} M, puis une exposition à la NIC à 10^{-5} M des neurones DUM issus de blattes qui ont ingéré des dsRNA-LacZ ou des dsRNA-Pamea7	170

Table des tableaux

Tableau 1 : Les sous-unités nicotiniques conservées chez les insectes	24
Tableau 2 : Les sous-unités nicotiniques divergentes chez les insectes	25
Tableau 3 : L'épissage alternatif des sous-unités nicotiniques chez les insectes	27
Tableau 4 : Profils pharmacologiques des nAChR1 et nAChR2 des neurones DUM du DGA de la blatte <i>Periplaneta americana</i> adulte	30
Tableau 5 : Profils pharmacologiques des nAChRD et nAChRN des neurones issus des ganglions thoraciques de la blatte <i>Periplaneta americana</i> adulte	31
Tableau 6 : Liste non-exhaustive de profils pharmacologiques de nAChRs natifs présents dans différents types cellulaires d'insectes.....	32
Tableau 7 : Tableau non-exhaustif représentant les réponses à l'ACh et NIC de divers nAChRs homopentamériques d'insectes exprimés en ovocyte de xénope	34
Tableau 8 : Tableau non-exhaustif représentant les combinaisons en sous-unités nicotiniques des nAChRs hétéromériques de la mouche <i>Drosophila melanogaster</i> , de l'abeille <i>Apis mellifera</i> et du bourdon <i>Bombus terrestris</i> et leur réponse à différents insecticides néonicotinoïdes.....	35
Tableau 9 : Tableau non-exhaustif des protéines auxiliaires qui interagissent avec les nAChRs.....	38
Tableau 10 : Tableau non-exhaustif des cibles des insecticides avec les familles d'insecticides neurotoxiques associées	55
Tableau 11 : Tableau non-exhaustif de l'effet d'insecticides néonicotinoïdes sur des préparations neuronales d'insectes ou des nAChRs natifs, recombinés ou hybrides	58
Tableau 12 : Tableau non-exhaustif des mutations ponctuelles des protéines cibles identifiées chez des souches d'insectes résistantes aux insecticides	68
Tableau 13 : Tableau non-exhaustif illustrant l'augmentation de l'efficacité de l'ARNi chez diverses espèces d'insectes lorsque les dsRNAs ingérés sont encapsulés dans des liposomes cationiques.....	84
Tableau 14 : Tableau non-exhaustif illustrant l'augmentation de l'efficacité de l'ARNi chez diverses espèces d'insectes lorsque les dsRNAs ingérés sont encapsulés dans des polymères	85

Tableau 15 : Tableau non-exhaustif illustrant l'efficacité des dsRNAs ingérés par diverses espèces d'insectes à partir de plantes infectées avec un virus de la mosaïque du tabac modifié	85
Tableau 16 : Tableau non-exhaustif illustrant l'efficacité des dsRNAs délivrés à partir d'un virus d'insecte modifié	86
Tableau 17 : Tableau non-exhaustif d'espèces d'insectes, appartenant à divers ordres, chez lesquelles un effet bioinsecticide de certains dsRNAs a été rapporté	88
Tableau 18 : Composition de la solution nutritive ingérée par les pucerons <i>Acyrtosiphon pisum</i>	95
Tableau 19 : Liste des gènes utilisés pour la conception des dsRNAs d'intérêt.	100
Tableau 20 : Fragments spécifiques des séquences nucléotidiques correspondant aux séquences des dsRNAs utilisés au cours de ce travail de thèse	101
Tableau 21 : Séquences des amorces utilisées pour la synthèse des dsRNAs ainsi que la température utilisée pour l'étape d'hybridation	103
Tableau 22 : Composition des solutions de lipoplexes contenant les dsRNAs d'intérêts qui sont ingérées par la blatte adulte <i>Periplaneta americana</i>	105
Tableau 23 : Composition des solutions de lipoplexes contenant les dsRNAs d'intérêt qui sont appliquées sur la face dorsale des pucerons adultes <i>Acyrtosiphon pisum</i>	106
Tableau 24 : Composition des solutions de lipoplexes contenant les dsRNAs d'intérêt qui sont ingérées par les larves de puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i> âgées d'un jour.	106
Tableau 25 : Liste des amorces et des températures utilisées pour les expériences de qPCR.....	109
Tableau 26 : Tableau représentant le pourcentage d'effets délétères cumulés sur des abeilles <i>Apis mellifera</i> (mortalité, abeille moribonde, locomotion défaillante, contraction anormale de l'abdomen, apathie et vomissement) après l'ingestion de dsRNA- <i>Apisum</i> β2 seuls ou combinés à l'imidaclopride (IMI) à des doses induisant de la mortalité chez le puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i>	131
Tableau 27 : Tableau représentant le pourcentage d'effets délétères cumulés sur des abeilles <i>Apis mellifera</i> (mortalité, abeille moribonde, locomotion défaillante, contraction anormale de l'abdomen, apathie et vomissement) après l'application topique de dsRNA- <i>Apisum</i> β2 seuls ou combinés à l'imidaclopride (IMI) à des doses induisant de la mortalité chez le puceron <i>Acyrtosiphon pisum</i>	132

Titre : Utilisation de la technique d'interférence ARN dirigée contre les acteurs du système cholinergique pour lutter contre les insectes ravageurs

Mots clés : Interférence ARN, Système cholinergique, Insecticide, Accommodation, *Acyrtosiphon pisum*, *Periplaneta americana*

Résumé: Aujourd'hui, l'augmentation des rendements agricoles pour répondre aux besoins alimentaires croissants se base encore sur l'utilisation de traitements insecticides pour protéger les cultures contre les insectes ravageurs. Cependant, l'utilisation non-raisonnée de ces insecticides a conduit à l'apparition d'effets néfastes sur des organismes non-cibles. De plus, l'augmentation du nombre d'insectes accommodés ou résistants aux insecticides a conduit à la diminution globale de leur efficacité. Ainsi, il est devenu indispensable de développer de nouvelles stratégies de lutte. Entre autres, l'interférence ARN (ARNi) apparaît comme un nouvel outil prometteur pour contrôler spécifiquement les populations d'insectes ravageurs. En ce sens, l'objectif de ce travail est d'évaluer l'utilisation de l'ARNi dirigée contre les acteurs du système cholinergique pour lutter contre les insectes ravageurs. Dans ce travail,

nous avons démontré que l'utilisation d'un ARN interférent qui cible la sous-unité nicotinique divergente Apisum β 2 du puceron *Acyrtosiphon pisum*, seul ou combiné à l'imidaclopride, permet de contrôler les populations de ce ravageur à différents stades de développement. De plus, des résultats préliminaires semblent indiquer que cibler l'acétylcholinestérase du puceron par l'ARNi pourrait également être une stratégie viable de lutte contre ce ravageur. Enfin, nous avons démontré que, chez la blatte *Periplaneta americana* accommodée à l'imidaclopride, l'utilisation d'un ARN interférent dirigé contre la sous-unité nicotinique Pame β 1 permet le retour à un phénotype sensible de ces insectes. Ainsi, ces travaux suggèrent que l'utilisation de l'ARNi dirigée contre les acteurs du système cholinergique pourrait être une stratégie importante de lutte contre les insectes ravageurs.

Title: Using the RNA interference technique targeting genes involved in the cholinergic system to control insect pests

Keywords: RNA interference, Cholinergic system, Insecticide, Accommodation, *Acyrtosiphon pisum*, *Periplaneta americana*

Abstract: Increasing agricultural yields to meet growing food needs is still based on the use of insecticide treatments to protect crops against insect pests. However, the widespread use of insecticides has led to negative effects on non-target organisms. In addition, the increase of the number of accommodated or resistant insects to insecticides has led to an overall reduction in their effectiveness. Therefore, it has become essential to develop new insect pest control strategies. Among them, RNA interference (RNAi) is emerging as a powerful tool for specifically controlling insect pests. The aim of this work was to assess the use of RNAi that targets proteins involved in the cholinergic system to control insect crop pests. In this work, we demonstrated that

the use of an interfering RNA targeting the divergent nicotinic acetylcholine receptor subunit Apisum β 2 of the aphid *Acyrtosiphon pisum*, alone or combined with imidacloprid, can control populations of this pest at different developmental stages. In addition, preliminary results suggest that targeting aphid acetylcholinesterase with RNAi could also be a viable strategy to control this pest. Finally, we have demonstrated, in the imidacloprid-accommodated cockroach *Periplaneta americana*, that the use of an interfering RNA targeting Pame β 1 subunit enabled the return of these insects to a sensitive phenotype. Altogether, these results suggest that the use of RNAi that targets the cholinergic system could be an important strategy to control insect pests.