



**HAL**  
open science

# Caractérisation des bases génétiques de la résistance du carpocapse des pommes aux (bio) insecticides pour leur détection moléculaire à haut débit dans les paysages

Mathilda Idier

## ► To cite this version:

Mathilda Idier. Caractérisation des bases génétiques de la résistance du carpocapse des pommes aux (bio) insecticides pour leur détection moléculaire à haut débit dans les paysages. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. Français. NNT: . tel-04517489

**HAL Id: tel-04517489**

**<https://anses.hal.science/tel-04517489v1>**

Submitted on 22 Mar 2024

**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.

**THÈSE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ**

**École Doctorale 536**  
Sciences et Agrosciences

**Mention de doctorat :**  
Sciences Agronomiques

**UR 1115 – Plantes et Systèmes de culture Horticoles**  
**INRAE**

Présentée par  
**Mathilda Idier**

---

**Caractérisation des bases génétiques de la  
résistance du carpocapse des pommes aux  
(bio)insecticides pour leur détection  
moléculaire à haut débit dans les paysages**

---

Soutenue publiquement le 07 Septembre 2023 devant le jury composé de :

Fabrice Chandre, DR IRD  
Valérie Raymond, PU Université d'Angers  
Gaëlle Le Goff, CR INRAE  
Magali Rault, MCF Université d'Avignon  
Claire Lavigne, DR INRAE  
Benoit Barrès, Chercheur ANSES  
Bertrand Gauffre, CR INRAE  
Myriam Siegwart, IE INRAE

**Rapporteur**  
**Rapporteure**  
**Examinatrice**  
**Examinatrice**  
**Directrice de thèse**  
**Encadrant de thèse**  
**Encadrant de thèse**  
**Encadrante de thèse**

# Résumé

Le carpocapse des pommes, *Cydia pomonella*, est un ravageur majeur des vergers de pommiers et de poiriers dans le monde entier. L'utilisation intensive de (bio)insecticides pour leur contrôle a conduit à l'apparition d'un nombre croissant de phénotypes résistants au sein des populations naturelles. Différents mécanismes à l'origine de ces phénotypes ont déjà pu être identifiés : des résistances dites 'liées à la cible' (RLC), via des modifications génétiques des cibles moléculaires des insecticides ou des résistances 'non liées à la cible' (RNLC), via notamment une augmentation de la détoxification, qui entraîne une dégradation des molécules insecticides avant qu'elles ne se fixent sur leur cible. Cependant, les bases moléculaires impliquées dans ces mécanismes n'ont pas été totalement identifiées, notamment pour les RNLC, où elles restent encore pour la plupart méconnues.

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette étude est l'identification des bases génétiques des RNLC, et en particulier de la détoxification, à différents (bio)pesticides chez *C. pomonella*. Le second objectif est de tester si ces RNLC confèrent des résistances croisées dans des populations résistantes à plusieurs substances actives (SA). Le troisième objectif, plus appliqué, est d'identifier des marqueurs permettant un diagnostic des phénotypes résistants par des approches moléculaires. Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé une approche d'évolution expérimentale combinée à un séquençage NGS, sur une population caractérisée comme résistante à différentes SA. Pour mener l'évolution expérimentale, trois SA insecticides ont été choisies : le chlorantraniliprole, la deltaméthrine et le spinosad, pour créer trois lignées différentes en exerçant des pressions de sélection différenciées avec les SA d'intérêt. Enfin, un séquençage en pool ARN et ADN des lignées obtenues a été effectué, afin d'identifier les variations génétiques associées aux phénotypes résistants.

Dans une première partie, l'évolution du phénotype des différentes lignées expérimentales a été analysée par l'utilisation de bioessais par ingestion et par des mesures d'activités enzymatiques. Nous avons notamment pu constater que malgré les pressions de sélection exercées, les activités enzymatiques de nos lignées n'étaient pas significativement différentes de notre souche sensible de référence.

Dans un second temps, via des analyses RNAseq, nous avons pu identifier des gènes présentant des profils d'expression différentielle selon les pressions de sélection de nos lignées. Nous avons recherché parmi ces gènes ceux connus pour être impliqués dans les RNLC, et avons identifié différentes enzymes impliquées dans la détoxification, notamment différentes monooxygénases à fonctions multiples (P450), et une glutathion-S-transférase (GST). Des gènes impliqués dans le système de perception d'odeurs et dans des mécanismes de stress, des familles n'ayant pas été associées à la résistance aux insecticides chez *C. pomonella*, ont également été identifiés. La recherche de polymorphismes dans les transcrits a également permis d'illustrer l'implication de protéines cuticulaires, de transport et du métabolisme intermédiaire, ainsi que différentes enzymes impliquées dans les transferts d'énergie aux enzymes de détoxification.

Enfin, par l'analyse DNaseq, nous avons cherché sur l'ensemble du génome des signatures de sélection et de variations de polymorphisme. Nous avons comparé la couverture de séquençage entre populations résistantes et sensibles afin d'identifier des variations de nombre de copies (CNVs) de certains gènes associés à la résistance. Pour l'identification d'association entre polymorphisme et résistance nous avons combiné une approche bayésienne et une approche de filtres sur les changements de fréquences alléliques entre générations et conditions.

L'ensemble de ces analyses a permis de confirmer le rôle de différentes enzymes déjà connues comme impliquées dans des mécanismes de détoxification dans nos phénotypes résistants, mais a également mis en lumière l'implication de familles de gènes qui n'avaient jusque-là pas été décrites. De plus, nous avons pu remarquer qu'aucun de nos résultats liés à la détoxification dans nos analyses transcriptomiques et génomiques n'étaient communs entre nos différentes lignées. Ces résultats contribuent ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes complexes associés à la résistance aux insecticides et fournissent une base pour le développement de nouveaux outils de détection de la résistance, basés sur des approches moléculaires.

# Abstract

The codling moth, moth, *Cydia pomonella*, is a major pest of apple and pear orchards worldwide. The intensive use of (bio)insecticides to control it has led to the evolution of a growing number of resistant phenotypes in natural populations. Various mechanisms at the origin of these phenotypes have already been identified: 'target site' resistance (TSR), via genetic modifications to the molecular targets of insecticides, or 'non-target-site' resistance (NTSR), notably via an increase in detoxification, which leads to the degradation of insecticide molecules before they bind to their target. However, the molecular bases involved in these mechanisms have not been fully identified, particularly for NTSR, where they remain largely unknown.

In this context, the main objective of this study is to identify the genetic basis of NTSR, and in particular detoxification, to different (bio)pesticides in *C. pomonella*. The second objective is to test whether these NTSR confer cross-resistance in populations resistant to several active substances (AS). The third, more applied, objective is to identify markers for diagnosing resistant phenotypes using molecular approaches. To meet these objectives, we used an experimental evolution approach combined with NGS sequencing, on a population characterised as resistant to different AS. Three insecticidal SAs were chosen for experimental evolution: chlorantraniliprole, deltamethrin and spinosad, to create three different lines by exerting differentiated selection pressures with the AS of interest. Finally, pooled RNA and DNA sequencing of the lines obtained was carried out to identify the genetic variations associated with resistant phenotypes.

In the first part, the evolution of the phenotype of the different experimental lines was analysed using ingestion bioassays and enzyme activity measurements. In particular, we were able to observe that despite the selection pressures applied, the enzymatic activities of our lines were not significantly different from our sensitive reference strain.

Secondly, using RNAseq analyses, we were able to identify genes with differential expression profiles according to the selection pressures of our lines. Among these genes, we looked for those known to be involved in RNLC and identified various enzymes involved in detoxification, in particular various multiple function oxidases (P450), and a glutathione-S-transferase (GST). Genes involved in the odour perception system and stress mechanisms, families not previously associated with insecticide resistance in *C. pomonella*, were also identified. The identification of polymorphisms variation in the transcripts illustrated the involvement of cuticular, transport and intermediary metabolism proteins, as well as various enzymes involved in the transfer of energy to detoxification enzymes.

Finally, using DNAseq analysis, we searched the entire genome for signatures of selection and polymorphism variations. We compared sequencing coverage between resistant and susceptible populations to identify copy number variations (CNVs) in certain genes associated with resistance. To identify associations between polymorphisms and resistance, we combined a Bayesian approach with a filter approach based on changes in allele frequencies between generations and conditions.

All of these analyses confirmed the role of various enzymes already known to be involved in detoxification mechanisms in our resistant phenotypes, but also highlighted the involvement of gene families that had not previously been described. In addition, we noticed that none of our results relating to detoxification in our transcriptomic and genomic analyses were common to our different lines. These results thus contribute to a better understanding of the complex mechanisms associated with insecticide resistance and provide a basis for the development of new resistance detection tools based on molecular approaches.

Mots clés : résistance, évolution expérimentale, étude d'association pangénomique (GWAS), biologie moléculaire, épidémiosurveillance

Keywords : resistance, experimental evolution, genome wide association study, molecular biology, epidemiological surveillance



Ces travaux de thèse ont été financés et soutenus par l'INRAE et l'ANSES (convention de financement PPV/2020) via la taxe sur les ventes de produits phytopharmaceutiques. Le produit de cette taxe est affecté à l'ANSES pour financer la mise en place du dispositif de surveillance des effets indésirables des produits phytopharmaceutiques, appelé "phytopharmacovigilance" (PPV), instauré par la loi d'avenir pour l'agriculture du 13 octobre 2014

# Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mes encadrants de thèse, Myriam, Bertrand et Benoit. Merci à tous les trois pour votre encadrement durant toute ma thèse. Ces années ont été intenses, mais grâce à vous j'ai su n'en retirer que le meilleur et en ressortir grandie. Vous avez été tous les trois complémentaires, en formant un trio idéal malgré la distance (Benoit, finalement on se sera plus vus à l'étranger qu'en France !), qui m'a permis d'en apprendre beaucoup et ce dans de nombreux domaines !

Merci d'avoir été à mon écoute, de m'avoir encouragée et d'avoir su voir le positif dans de nombreuses situations où ce n'était pas forcément facile à envisager.

Merci pour votre bienveillance, pour vos conseils et merci de m'avoir fait confiance dans ce projet.

Un merci particulier à Claire, ma directrice de thèse, pour tes conseils et tes relectures tout au long de ma thèse et encore désolée de t'avoir embêtée de nombreuses fois pour ta signature !

Merci à Fabrice Chandre, Gaëlle Le Goff, Magali Rault et Valérie Raymond, membres de mon jury de thèse, d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je vous remercie grandement pour les discussions très enrichissantes que nous avons eues lors de ma soutenance.

Je voudrais également remercier les membres de mon comité de thèse, Anne-Sophie Walker, Julien Foucaud et Jean-Philippe David. Vous avez pu suivre ce travail depuis le début jusqu'à son aboutissement, merci de m'avoir guidée à travers vos conseils et toutes vos remarques qui m'ont énormément aidée. Jean-Philippe, merci encore de m'avoir accueillie lors de mon séjour à Grenoble, qui m'a beaucoup apporté.

Je souhaite également remercier toutes celles et ceux qui de près ou de loin ont pu contribuer à ce travail de thèse et son aboutissement.

Cette thèse repose sur une manip qui a nécessité beaucoup de bras, merci encore à toutes les personnes qui ont bien voulu passer une tête, prêter des bras et passer un peu de temps à l'insectarium pour poser un nombre astronomique de larves et boucher un nombre tout autant inimaginable de tubes.

Je ne peux commencer que par remercier deux personnes qui ont contribué d'une façon incommensurable à cette thèse, aussi bien au travail qu'en dehors : Sandrine et Elodie. En vous rencontrant j'ai trouvé plus que des collègues, j'ai rencontré de vraies amies qui me sont chères et que j'ai la chance d'avoir à mes côtés. Sandrine, si je commence à énumérer les fois où tu as sauvé ma manip, mes carpos (ou même moi en général hahaha) je pense qu'on en a encore pour un moment ! Merci d'avoir été mon acolyte pour péter tous les records de l'insectarium, et ce toujours avec la bonne humeur et la gentillesse qui te caractérise ! Elodie, la plus rapide des poseuses de larves ou devrais-je dire la meilleure moitié de notre duo, merci pour toutes les fois où on a chanté ensemble, pour les fou-rires, pour tes messages, tes avalanches de post-its et pour tout le reste. On le fera ce concert de Céline et Dion !! Merci à toutes les deux d'avoir été un soutien sans faille à tous les moments où j'ai pu en avoir besoin (et merci pour les chocolats). Cette fois, j'ai mal à mon Avignon à l'idée de ne plus vous voir et de ne plus entendre vos rires quotidiennement !

Anahi, merci pour ton aide et tous les moments passés au Pôle Nord ensemble, ainsi que pour ta déconne à toute épreuve dans l'enceinte de l'insectarium ! Pas merci pour les crises cardiaques par contre...

Jérôme, je ne pense pas avoir la place pour te remercier assez, compte-tenu de toute l'aide précieuse que tu m'as apportée, que ce soit pour la bio-informatique ou pour ces milliers de papillons disséqués ensemble et les manips de biologie moléculaire ! Merci d'avoir répondu à tous mes appels à l'aide et merci pour ton implication sur les analyses génomiques. Et aussi d'avoir su garder la tête froide et ton humour face aux embûches qu'on a pu croiser !

Après le labo, c'est au bureau que j'ai pu passer un grand moment. Et dans le hasard de l'attribution des bureaux je me suis retrouvée avec deux personnes exceptionnelles : Perrine et Lucas. PP et Lulu les sangs, vous êtes les meilleurs. Sans vous (et sans cette fameuse soirée raclette) je pense que cette thèse n'en serait pas où elle en est et je n'en serais pas où j'en suis moi non plus ! Merci d'avoir fait de notre bureau un endroit où il faisait bon venir et que je retrouvais avec sourire et envie. Merci pour les nombreux fou-rires que nous avons eu ensemble (que je ne vais pas pouvoir énumérer pour des raisons évidentes), d'avoir été les plus beaux modèles de montage Photoshop et les meilleurs co-parents de Queen B, d'avoir eu le démon du jeu (bientôt le mimi), de m'avoir remonté le moral quand j'en avais besoin et de m'avoir conseillée sur tous les sujets. Merci d'avoir fait des uchi larges accompagnés de

consignes mystiques avec moi ou d'être tombé par terre sous nos rires et notre désespération générale.

Merci infiniment d'avoir été là, d'être entrés dans ma vie et tout simplement d'avoir été vous, que ça ait été à 3m ou même à 201 ou 439 kilomètres (oui j'ai compté les kilomètres).

Merci également à toute la troupe de PSH ! Quentin, le 4<sup>e</sup> membre de notre bureau, merci pour toutes tes visites inopinées dans le bureau et pour le trafic auvergnat (au fait, t'as déménagé ?). Louise, je n'aurai pas pu rêver de meilleure personne avec qui partager mes neurones (aishhhh~) ! Ludivine (avec Louise vous resterez mes blasées sûres toutes les deux !), Thomas, Louna, Adrien, Noé, Julie, Léa, Inessa et tous les autres, merci pour les rendez-vous en ville ou aux 2J, pour les soirées ensemble, pour les randos, pour les Secret Santas et pour tous les moments que nous avons passé ensemble.

Je voudrais également remercier toutes les personnes d'avant la thèse, mes amis de Nice et d'ailleurs ! Merci pour votre présence depuis tant de temps !

Merci aux deux Nico : Nico R. et Nico B., tous les deux avez su me donner l'envie de me lancer dans l'aventure qu'est la thèse après ce stage de M2 qui a été révélateur pour moi, et vous recroiser à Avignon a toujours été un grand plaisir !

Merci à mes amis de la fac et à ceux de longteeeeeemps avant : Morgane (qui aurait pu imaginer à la Mad Sup' qu'on écrirait nos thèses en même temps ?), Alexandrine, Lana, Hannah, Tara, Chloé, Claire, Lisa, Anaïs et Jonathan, Alexia, Elodie, Julie, Elena et Manon (les copines du latin, *quis hoc praedicare potuit* ? Et oui j'ai sorti le Gaffiot), Thomas et tous les autres !

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille pour leurs attentions, leurs encouragements, leur soutien et leur affection tout au long de ces années de thèse. Vous êtes mon socle depuis toujours.

Un merci tout particulier à mes cousins : Jérémy, Delphine, Emilie, Amandine, Mélanie et Camille. Nos cousinades (ainsi que quelques contre-cousinades, oups), vos messages et nos bêtises ainsi que votre amour m'ont portée jusqu'ici. En plus d'être une cousine de qualité, maintenant je suis même docteure ! (Promis après le permis et la thèse, normalement *j'abandon ship* et j'arrête !).

Mes grands-mères, merci d'être là, et mes grands-pères qui veillent sur moi, merci. Je pense à vous tous très fort.

Papa et Maman, merci. Dire que je vous casse les pieds depuis mon arrivée en catastrophe une fin de mois d'août ! Merci de me soutenir (et je peux même dire merci pour le *support* en anglais dans le texte, hein Papa ?) depuis toujours. Merci pour vos visites avignonaises, nos excursions ensemble (et surtout celle de Paris, merci Maman !!), vos lettres et vos colis ainsi que vos chamailleries presque quotidiennes en visio !

Merci pour tout ce que vous m'avez apporté. Il m'est impossible de trouver les mots exprimant tout l'amour que je vous porte, alors je resterai simple. Je vous aime.





# Introduction générale

I.	Evolution de la résistance aux insecticides .....	1
II.	Mécanismes des résistances aux insecticides.....	6
	a. Modification ou surexpression de cible moléculaire de l’insecticide – RLC .....	6
	b. Résistance métabolique – RNLC .....	6
	i. MFO.....	8
	ii. GST.....	9
	iii. CbE.....	9
	iv. UGT.....	10
	v. ABC-transporteurs .....	10
	c. Autres mécanismes de RNLC .....	10
	i. Résistance comportementale .....	11
	ii. Pénétration réduite.....	11
	d. Cas des résistances à plusieurs substances actives.....	12
III.	Bases génétiques des résistances et génotypage .....	14
	a. Modifications génomiques à l’origine de résistances non liées à la cible .....	14
	b. Méthodes pour identifier les bases génétiques de la résistance.....	15
	i. Approches pour identifier des polymorphismes génétiques associés aux phénotypes.....	15
	ii. Validation fonctionnelle.....	19
IV.	Méthodes pour caractériser et surveiller les résistances aux insecticides.....	20
	a. Méthode de phénotypage : Bioessais par ingestion / par contact.....	20
	b. Dosages biochimiques.....	21
	c. Méthodes moléculaires pour détecter les résistances.....	23
	i. Identifier des mutations ponctuelles chez un individu ou dans une population .....	23
	ii. Quantifier les copies de gènes ou variations d’expression chez un individu .....	24
V.	Le carpocapse des pommes, <i>Cydia pomonella</i> .....	26
	a. Généralités biologiques et physiologiques.....	26
	b. Méthodes de lutte actuelles .....	27
	i. Insecticides (synthétiques et naturels) .....	27
	ii. Méthodes de lutte alternatives aux insecticides contre <i>C. pomonella</i> .....	30
	c. État des lieux des résistances aux insecticides.....	31
	d. Mécanismes de résistance aux insecticides chez <i>C. pomonella</i> .....	31
VI.	Problématique.....	33

# Chapitre 1 – Mise en place de l’expérimentation d’évolution et reséquençage

I.	Introduction.....	35
II.	Objectifs et hypothèses de ce chapitre.....	37
III.	Matériels et méthodes.....	39
	a. Evolution expérimentale.....	39
	i. Populations utilisées dans l’évolution expérimentale .....	39
	ii. Conditions d’élevage .....	39
	iii. Pression insecticide .....	46
	iv. Design expérimental .....	46
	b. Phénotypage de la résistance .....	49
	i. Bioessais par ingestion.....	49
	ii. Analyses biochimiques.....	50
	c. Analyses statistiques.....	52
	i. Bioessais par ingestion.....	52
	ii. Analyses biochimiques.....	52
	iii. Effets sub-létaux de l’exposition aux insecticides : analyse de la cinétique de développement de nos différentes lignées.....	52
IV.	Résultats.....	54
	a. Mise en œuvre d’une évolution expérimentale sur lépidoptère.....	54
	i. Optimisation des méthodes d’élevage pour acclimater et augmenter le nombre d’individus.....	54
	ii. Détermination des pressions de sélection.....	57
	iii. Choisir le bon phénotypage.....	58
	b. Effets sub-létaux de l’exposition aux insecticides.....	69
	i. Variation du temps de développement de <i>C. pomonella</i> , indépendamment de son exposition à des insecticides.....	69
	ii. Influence de 3 insecticides sur la durée de développement de <i>C. pomonella</i> .....	69
V.	Discussion.....	75
	a. Optimisation d’élevage dans un objectif d’évolution expérimentale sur lépidoptère ...	75
	b. Quel phénotypage choisir ?.....	77
	c. Effets sub-létaux de l’exposition aux pesticides.....	79



## Chapitre 2 – Genetic characterization of multiple insecticide resistance in a field population of *Cydia pomonella* (L.) using RNAseq

Avant-propos .....	81
Abstract .....	85
I. Introduction.....	86
II. Materials and methods .....	89
a. Population sampling and rearing .....	89
b. Experimental evolution with three insecticides.....	89
c. RNA sequencing.....	91
d. Data analysis.....	91
i. RNAseq data .....	91
ii. Differential expression.....	92
iii. SNP Filtering and research of variants.....	92
III. Results.....	94
a. Experimental evolution.....	94
b. Sequencing metrics and parameters.....	94
c. Differentially expressed genes.....	94
d. Detection of transcript polymorphism .....	95
IV. Discussion.....	97
Acknowledgements .....	101
References.....	102
Tables and figures.....	131

## Chapitre 3 – Identification de marqueurs génomiques liés à la résistance aux insecticides par utilisation de séquençage génomique à haut-débit

I.	Introduction.....	148
II.	Objectifs de ce chapitre .....	151
III.	Matériel et méthodes.....	152
	a. Matériel biologique, extraction ADN et séquençage.....	152
	b. Analyses bio-informatiques .....	155
	i. Recherche de variants .....	155
	ii. Analyses de diversité génétique.....	155
	iii. Recherche de signatures de sélection.....	156
	1. Analyse par filtrage de fréquences alléliques .....	156
	2. Analyse par scan génomique .....	157
	3. Analyse du variation de nombre de copies de gènes.....	158
IV.	Résultats.....	161
	a. Diversité génétique et structuration des échantillons au court de l'expérimentation	161
	b. Recherche de signatures de sélection .....	166
	i. Chlorantraniliprole.....	166
	1. Approche par filtrage de fréquences alléliques .....	166
	2. Approche par scan génomique.....	166
	3. Détection de variations du nombre de copies de gènes .....	167
	ii. Deltaméthrine.....	178
	1. Approche par filtrage de fréquences alléliques .....	178
	2. Approche par scan génomique.....	178
	3. Détection de variations du nombre de copies de gènes .....	179
	iii. Spinosad.....	194
	1. Approche par filtrage de fréquences alléliques .....	194
	2. Approche par scan génomique.....	194
	3. Détection de variations du nombre de copies de gènes .....	195
	iv. Gènes en commun entre substances actives et entre analyses.....	206
V.	Discussion.....	210

## Discussion générale

I.	Rappel du contexte.....	214
II.	Utilisation d'une expérimentation d'évolution et reséquençage dans la recherche de résistances .....	215
	a. Synthèse des méthodes et résultats.....	215
	b. Mise en place de l'expérimentation d'évolution et reséquençage .....	218
	c. Structuration génétique de nos différentes lignées .....	219
III.	Limites de l'étude et perspectives .....	220
	a. D'autres mécanismes de résistance ?.....	220
	b. Annotation du génome.....	221
	c. Création d'un outil de détection des résistances .....	221
	Table des figures et tableaux .....	223
	Références bibliographiques.....	228
	Communications associées à ce travail.....	253



# Introduction générale

## I. Evolution de la résistance aux insecticides

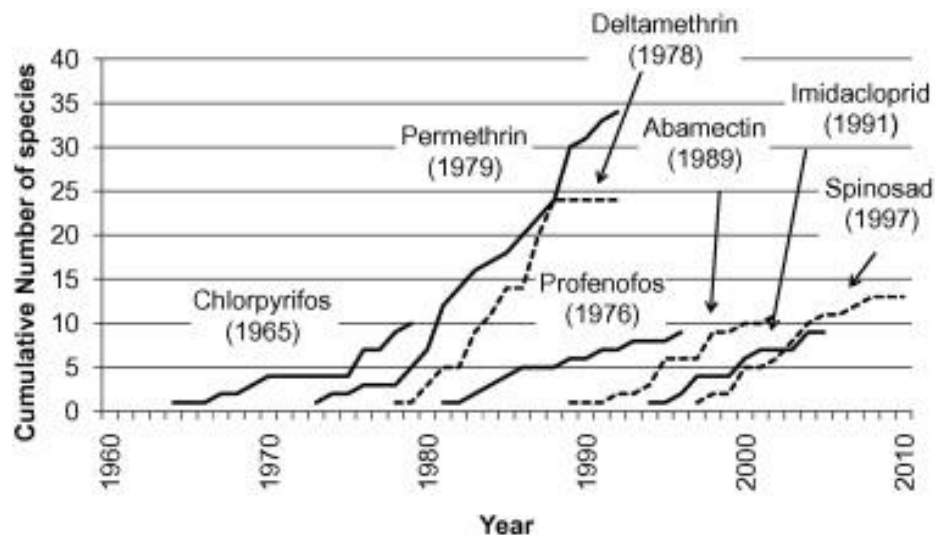
### *Contexte*

Dans leur environnement, les organismes sont soumis à différentes contraintes provenant de multiples sources, entraînant des réponses évolutives qui permettent une adaptation à ces conditions environnementales.

Ces contraintes peuvent être biotiques, comme la présence de prédateurs ou abiotiques, telles que le climat ou les activités anthropiques. Chez les insectes ravageurs des cultures, l'utilisation de pesticides engendre une pression de sélection majeure sur les populations de ces organismes biologiques dans cet environnement agronomique. Le contrôle des ravageurs de cultures est aujourd'hui encore largement assuré par l'utilisation de pesticides, avec pour objectif une production agricole pouvant subvenir aux besoins de populations humaines toujours croissantes. En réponse à cette pression de sélection, il arrive fréquemment d'observer l'émergence d'individus résistants dont la multiplication et la propagation dans les cultures peuvent aboutir, à terme, à une perte d'efficacité des pesticides.

### *Qu'est-ce qu'une résistance ?*

Depuis la première documentation de ce phénomène, observé sur des populations de cochenilles devenues résistantes à de la bouillie sulfocalcique en 1914 (Melander, 1914), la question de la résistance est devenue de plus en plus importante dans le champ scientifique. En effet, depuis la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle, le nombre de cas de résistances aux insecticides n'a cessé d'augmenter suite à une utilisation intensive et répétée de ces produits (Sparks & Nauen, 2015) (Figure 1).



**Figure 1 :** Nombre cumulé d'espèces reportées comme étant résistantes à la matière active indiquée, pendant les 14 ans suivant leur mise sur le marché, d'après Sparks et al., 2011.

Ainsi, avec les avancées scientifiques, différentes définitions de la résistance ont pu être proposées. La première définition a été proposée par l'OMS en 1956 : « [La résistance est] le développement de la capacité d'une souche d'insectes à tolérer des doses de substances toxiques qui s'avèreraient mortelles pour la majorité des individus d'une population normale de la même espèce. » (OMS, 1956).

Cette définition a ensuite été améliorée, en y ajoutant la notion d'héritabilité : « La résistance est un trait héritable qui confère une tolérance accrue vis-à-vis d'un pesticide ou d'un groupe de pesticides, de sorte à ce que le individus résistants survivent à une concentration de ou des produits expérimentés qui est normalement létale pour leur espèce. [...] On peut considérer que la proportion de survivants (hétérozygotes pour commencer, puis un certain nombre d'homozygotes au fur et à mesure que la sélection s'opère) reflète la fréquence du ou des gènes qui codent pour certains mécanismes de résistance et confèrent donc la résistance à l'individu qui en est porteur. » (OMS, 1992).

Enfin, l'IRAC (Insecticide Research Action Committee) a également proposé une dernière définition, basée sur l'aspect de la résistance en pratique : « [La résistance est] un changement héréditaire de la sensibilité d'une population de ravageurs qui se reflète dans les échecs répétés d'un produit phytosanitaire à atteindre le niveau de contrôle attendu lorsqu'il est utilisé contre l'espèce en cause conformément aux recommandations d'utilisation ».

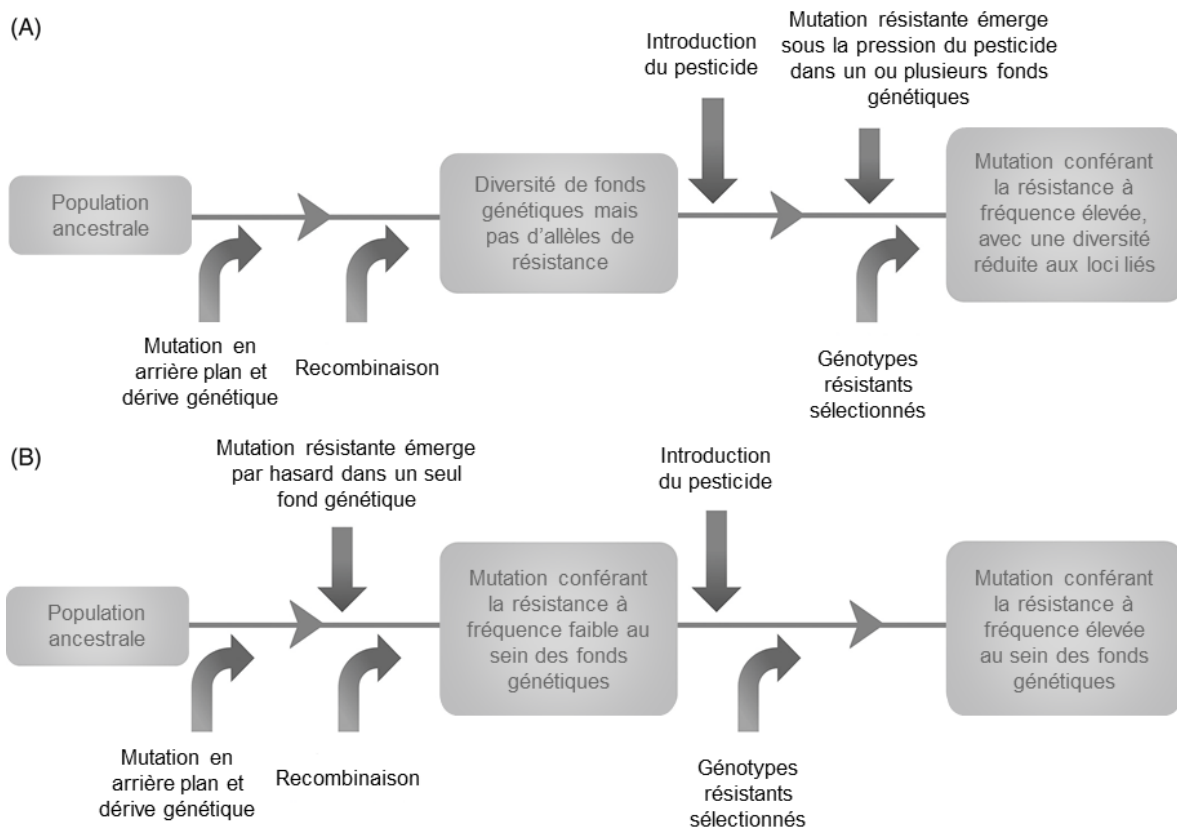
La résistance aux pesticides est donc la capacité héréditaire d'un individu à survivre à la dose de pesticide recommandée et appliquée en suivant les recommandations d'usage qui aurait dû lui être mortelle, tout en pouvant produire une descendance viable.

### *Origine des résistances et évolution*

Plusieurs mécanismes ont pu être observés quant à l'origine des résistances présentes dans les populations d'insectes ravageurs.

Une review à ce sujet d'Hawkins et al. (2019), liste les différentes mécanismes existants :

- Les mutation *de novo*. Dans ce cas, des mutations conférant des avantages sélectifs peuvent apparaître spontanément après le début de l'utilisation du pesticide. Ces mutations vont émerger sous la pression de sélection et vont se disperser en voyant leur fréquence augmenter dans la population grâce à leur avantage sélectif, plutôt qu'être perdues avec les phénomènes de dérive génétique (Messer & Petrov, 2013) (Figure 2A).
- La sélection depuis la variation génétique existante. Ici, des mutations avantageuses déjà présentes dans les populations vont voir leur fréquence augmenter, en réponse à la pression de sélection exercée (Barrett & Schluter, 2008) (Figure 2B).



**Figure 2 :** Illustration des mécanismes d'apparition des résistances aux pesticides

A) par mutation de novo B) par sélection depuis la variation génétique existante, d'après Hawkins et al. 2019.

Ces deux mécanismes sont ceux qui arrivent de la façon la plus fréquente, mais d'autres mécanismes plus marginaux existent également. Il peut arriver que des espèces soient intrinsèquement résistantes : il y aura en une (ou des) mutation(s) avantageuses, dans la population, mais à une fréquence assez élevée pour que la population soit considérée comme résistante (Lucas et al., 2015). Il se peut également qu'un mécanisme physiologique ou métabolique nécessaire au fonctionnement de l'individu soit également efficace dans la résistance au pesticide et verra ainsi son activité amplifiée (Song et al., 2011).

Enfin, des transferts horizontaux peuvent permettre d'introgresser la mutation responsable de la résistance dans de nouveaux individus depuis une autre espèce mécanisme très présent chez les bactéries, mais très peu chez les eucaryotes (Hedrick, 2013).

Ces résistances peuvent suivre une évolution rapide, en réponse à l'intensité du traitement pesticide, engendrant de fait une forte pression de sélection (Palumbi, 2001). Les individus résistants ayant un avantage sélectif vont donc se reproduire en plus grande quantité,



augmentant ainsi leur proportion au sein de la population. La trajectoire évolutive des résistances va être conditionnée par différents facteurs, dépendant (Hawkins et al., 2019; Tabashnik, 1990) :

- De l'espèce considérée et de ses caractéristiques biologiques intrinsèques (potentiel reproductif et temps de génération par exemple)
- De la population de ravageurs considérée et de ses caractéristiques (taille, possibilité d'immigration et/ou de dispersion des individus, ...)
- Du type de mécanisme de résistance
- De bases génétiques de la résistance (nombre de loci impliqués, niveau de dominance de l'allèle résistant, ...)
- De la substance active du pesticide (mode d'action, rémanence, ...)
- Des stratégies opérationnelles sur le terrain : utilisation du pesticide (dose, fréquence, ...) et des stratégies d'application (mixture, rotation, mosaïque spatiale, ...).

## II. Mécanismes des résistances aux insecticides

Les résistances des ravageurs aux insecticides sont la conséquence d'une grande variété de mécanismes sous-jacents (R4P Network, 2016; Soderlund & Bloomquist, 1990). Ceux-ci sont souvent regroupés en plusieurs catégories selon s'ils sont liés ou pas à la cible moléculaire de l'insecticide.

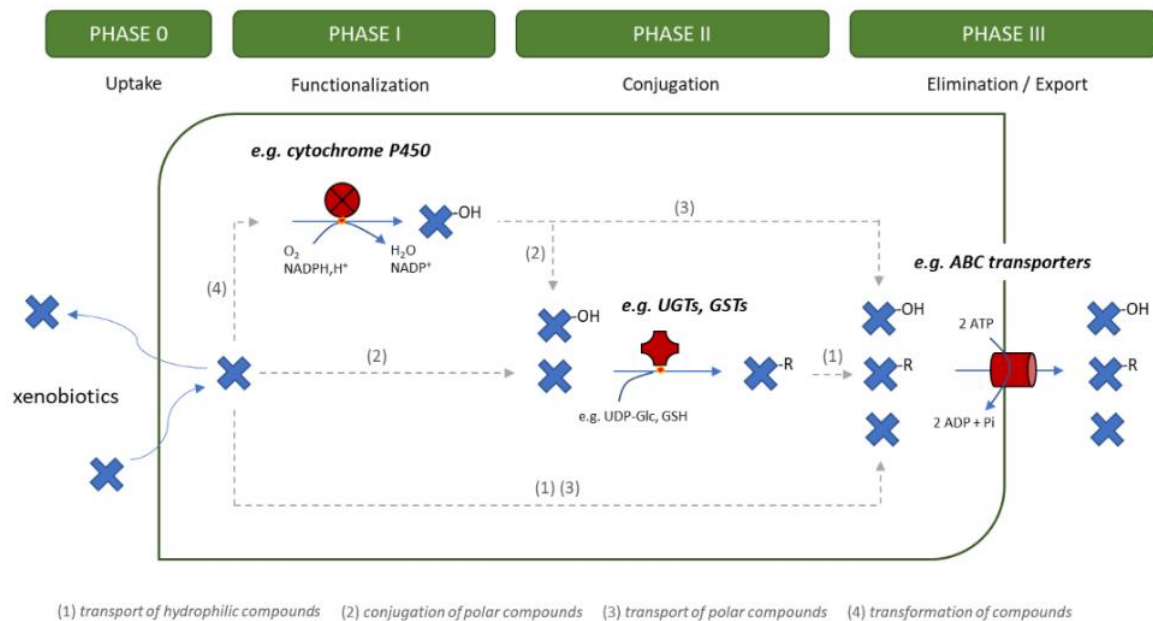
### a. Modification ou surexpression de cible moléculaire de l'insecticide – RLC

La première catégorie de résistance est celle liée à la cible moléculaire de l'insecticide (résistance liée à la cible : RLC). Les mutations à l'origine de ce type de résistance engendrent soit une modification de la structure tri-dimensionnelle de la cible en diminuant son affinité avec la molécule d'insecticide (Somers et al., 2018), soit une surexpression de la cible, diluant ainsi l'effet de l'insecticide. Ce type de résistance est relativement bien connu car très répandu et impliquant peu de gènes. En effet, la majorité des gènes codant pour ces protéines ciblées par les insecticides sont connues et bien conservés chez les insectes car ils prennent part à des processus essentiels dans la physiologie de l'insecte (système nerveux par exemple). Ce type de résistance entraîne souvent des résistances croisées entre les substances actives ayant le même mode d'action, et donc la même cible. Les RLC sont monogéniques (car elles concernent la cible moléculaire de l'insecticide) et différents modèles d'évolution ont pu montrer que sous l'effet de la sélection, les résistances monogéniques ont plus de chance d'avoir un effet fort sur le phénotype de l'individu en étant doté (Groeters & Tabashnik, 2001; Roush & Daly, 1990).

### b. Résistance métabolique – RNLC

La deuxième catégorie de résistance correspond à la résistance non liée à la cible (RNLC). Parmi cette catégorie, la résistance métabolique est l'un des mécanismes les plus couramment décrits chez les insectes. La résistance métabolique consiste en la dégradation de la molécule de xénobiotique par des enzymes appartenant au mécanisme de détoxification de l'insecte. Chez les insectes ce système est particulièrement développé et est composé principalement de 4 familles d'enzymes : les oxygénases à fonction multiple (MFO), les glutathion-S-transférases (GST), les carboxylestérases (CbE) et les UDP-glucosyltransférases (UGT).

Bien qu'étant controversée, une décomposition en trois phases peut être faite de la détoxification.



**Figure 3 :** Schéma général montrant les différentes voies d'élimination des xénobiotiques, d'après Amezian et al., 2021.

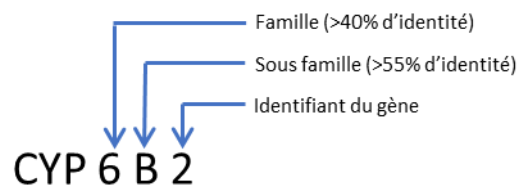
Dans la phase I, dite de fonctionnalisation, se déroulent des réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse grâce aux MFO et CbE qui vont rendre des molécules insecticides non-polaires « fonctionnelles ». Cela va pouvoir faciliter les réactions de conjugaison qui suivent, puis leur excrétion si elles sont suffisamment hydrophiles. Dans la phase II, dite de conjugaison, des GST et UGT vont catalyser la conjugaison de ces molécules (via des glutathionylations, acétylations ou glucuronidations) afin de faciliter leur excrétion en les rendant plus solubles. Le résultat de cette réaction est un xénobiotique conjugué. Enfin la phase III, dite d'excrétion, nécessite des ABC-transporteurs qui vont permettre l'efflux du xénobiotique, conjugué ou non, grâce à une réaction d'hydrolyse de l'ATP.

Cependant, dans la réalité cette cascade n'est pas forcément linéaire. Selon le type de xénobiotique et/ou son état après certaines réactions, les différentes phases peuvent être interchangeables et/ou ne pas avoir lieu pour aboutir à l'excrétion et l'élimination de la molécule. Cela ne va donc pas obligatoirement impliquer toutes les enzymes pouvant participer à la cascade de détoxification, dont leurs caractéristiques vont être détaillées ci-dessous.

## i. MFO

Parmi les différentes enzymes impliquées dans la détoxification, les monooxygénases à fonction multiple à cytochrome P450 (MFOs ou CYPs pour les gènes) font partie des enzymes de détoxification les plus importantes chez les insectes (Wilkinson, 1983). Ce sont des protéines à noyau ferreux membranaires microsomiales ou solubles, qui vont catalyser des réactions d'oxydation avec du NADPH et de l'oxygène, sur une grande variété de substrats. Elles sont très étudiées pour leur implication dans les mécanismes de détoxification mais sont également impliquées dans un grand nombre d'autres mécanismes, allant des systèmes hormonaux et phéromonaux jusqu'à la production de protéines cuticulaires (Qiu et al., 2012; Rewitz et al., 2006).

Il existe plus de 11 clans de MFOs dans le règne animal, composés de 70 familles et de 127 sous-familles. Leur nomenclature ne tient pas compte des clans et est détaillée ci-dessous :



**Figure 4 :** Nomenclature des monooxygénases à fonction multiple à cytochrome P450

Chez les insectes, elles sont classées en 6 clans : les CYP mitochondriales, les CYP2, les CYP3, les CYP4, les CYP16 et les CYP20 (Dermauw et al., 2020; Nelson et al., 2013). Dans chacun de ces clans ont été identifiées des MFO responsables de la résistance à des insecticides (Feyereisen, 2006), notamment dans les clans CYP3 et CYP4 au sein desquels on retrouve le plus de MFO impliquées dans les mécanismes de détoxification. Les gènes CYP9 et CYP6 (appartenant aux clans CYP3 et CYP4) sont, par exemple, responsables de résistances à diverses substances actives chez de nombreux insectes (Denholm et al., 1998; Li et al., 2007) : CYP6D1 cause une résistance à un organo-phosphoré (diazinon) chez *Musca domestica* (Kasai and Scott, 2000), CYP6G1 engendre une résistance aux pyréthrinoïdes chez *Drosophila melanogaster* et *Drosophila simulans* (Daborn et al., 2002; Le Goff et al., 2003) ou CYP6Z1 qui est impliqué dans une résistance à la perméthrine chez *Anopheles gambiae* (Nikou et al., 2003).

ii. GST

Les glutathion-S-transférases (GST) appartiennent à la famille des transférases. Elles sont principalement connues pour protéger les insectes des effets toxiques des produits chimiques des plantes et des pesticides (Haritos et al., 1996). Ces enzymes catalysent la conjugaison du glutathion (GSH) avec des composés électrophiles endogènes ou xénobiotiques, comme ceux produits lors de la phase I de la détoxification. Cette conjugaison va rendre l'élimination de ces molécules plus facile (Enayati et al., 2005). Elles peuvent également être impliquées dans des mécanismes de séquestration de xénobiotiques lors de la conjugaison (Feyereisen, 1995; Pavlidi et al., 2018).

Les GST peuvent être classées en 3 groupes selon leur localisation cellulaire : elles peuvent être cytosoliques, mitochondriales ou microsomales. Les GST cytosoliques peuvent appartenir à 6 différentes familles (lorsqu'elles sont >40% d'identité entre elles) dont 2 qui sont spécifiques aux insectes et qui sont connues pour être impliquées dans la détoxification : les classes *epsilon* et *delta* (Enayati et al., 2005; Ranson et al., 2002).

iii. CbE

Les carboxylestérases (CbE) sont des enzymes catalysant des réactions d'hydrolyse de liaisons esters carboxyliques, résultant en la formation d'un acide et d'un alcool. C'est le deuxième groupe principal d'enzymes à participer à la phase de fonctionnalisation de la détoxification (Oakeshott et al., 2003, 2005).

Elles se distinguent en 3 classes et différents clades (Ranson et al., 2002). La première classe se constitue de protéines impliquées dans des fonctions neuronales, sans lien avec la détoxification. La deuxième classe se compose de protéines essentiellement sécrétées, impliquées dans les systèmes hormonaux et phéromonaux. La troisième classe est composée d'estérases intracellulaires ayant une fonction dans la détoxification (Oakeshott et al., 2005). La diversité de ces enzymes joue un rôle important dans les mécanismes de résistance à plusieurs substances actives, où il a été montré que l'abondance de différentes formes de CbE vont participer à la résistance (Farnsworth et al., 2010).

Comme les GST, elles peuvent participer à la séquestration de xénobiotiques (Bass & Field, 2011). Ce mécanisme est notamment à l'œuvre dans la résistance de *M. domestica* au malathion (organophosphoré) (Claudianos et al., 1999) ou dans la poly-résistance de *Myzus persicae* à

des carbamates (pirimicarbe et aldicarbe) et un organophosphoré (oxydemeton-méthyl) (Bass et al., 2014; Field & Devonshire, 1997).

#### iv. UGT

Les UDP-glycosyltransférases (UGT) font partie de la famille des transférases, comme les GST. Elles sont responsables de la conjugaison de substrats endo et xénobiotiques lipophiles en des composés plus hydrosolubles pour les rendre plus facilement excrétables ou séquestrables, via la conjugaison d'un glucoside sur un alcool ou une amine (Bock, 2016; Heidel-Fischer & Vogel, 2015). Ce type d'enzyme est relativement peu décrit chez les insectes, même si elles sont connues pour être impliquées dans un grand nombre de fonctions en plus de leur rôle dans la détoxification des xénobiotiques, comme l'olfaction ou la formation de cuticule (Ahn et al., 2012).

#### v. ABC-transporteurs

Ce mécanisme correspond à la phase d'excrétion du xénobiotique grâce à l'action des ABC-transporteurs. Même si ce type de transporteur se retrouve dans tous les règnes du vivant et est considéré comme appartenant à l'une des plus grandes des familles de gènes (Higgins, 1992), ils sont relativement peu décrits chez les insectes. Ils ont toutefois été classés en 8 groupes chez les insectes, allant de ABC-A à ABC-H (Dermauw et al., 2013), et ont récemment été identifiés comme étant impliqués dans des phénotypes résistants liés à 27 substances actives insecticides et acaricides appartenant à 9 familles chimiques différentes (Dermauw & Van Leeuwen, 2014) via des mécanismes facilitant l'excrétion de la molécule de xénobiotique. Notons qu'il est également possible qu'une mutation du transporteur lui-même soit à l'origine de résistance, car il peut être la cible moléculaire de certaines familles chimiques, notamment les benzoylurées (Matsumura, 2010) ou les toxines produites par *Bacillus thuringiensis* (Heckel, 2012).

#### c. Autres mécanismes de RNLC

D'autres mécanismes de la catégorie RNLC ont été décrits chez les insectes. Ils peuvent parfois être une composante non-négligeable des phénomènes de résistances observés dans les populations d'insectes, en particulier les mécanismes de résistance comportementale et de réduction de la pénétration des insecticides.

i. Résistance comportementale

La résistance comportementale consiste en la modification du comportement de l'insecte amenant à un évitement de l'insecticide. Peu d'études se concentrant sur ce phénomène ont pu montrer que l'évitement était un trait héritable chez les populations de ravageurs (Zalucki & Furlong, 2017). Il a cependant été mis en évidence chez le moustique que l'utilisation massive de moustiquaires imprégnées avec de l'insecticide avait changé la préférence d'environnement de ponte et le rythme de ponte des femelles (Stone et al., 2012) ; et chez la mouche domestique que des individus étaient capables d'éviter des pièges traités avec des insecticides (Hubbard & Gerry, 2021). Une autre étude basée sur la tordeuse du thé a pu montrer qu'un changement dans les récepteurs olfactifs de certains individus leur conférait une résistance aux phéromones utilisées pour de la confusion sexuelle, et grâce à des croisements, il a pu être montré que ce trait comportemental était héritable comme un seul locus autosomique (Tabata et al., 2007).

ii. Pénétration réduite

La résistance par pénétration réduite est la conséquence d'une modification de la composition de la cuticule de l'insecte ou de son épaissement. La revue de littérature de Balabanidou et ses collaborateurs (Balabanidou et al., 2018) a pu montrer que ces deux types de mécanismes peuvent être des causes de résistance, même si leur fonctionnement et les déterminants impliqués ne sont pas encore complètement élucidés. Plusieurs études chez *Plutella xylostella* ont permis de mettre en évidence l'implication de gènes dans l'épaissement de la cuticule, en surexprimant des protéines structurales ou des enzymes en modifiant la composition suite à une exposition à cinq insecticides de différentes familles chimiques (chlorantraniliprole (diamide), dinotéfurane (néonicotinoïde), inodxarbe (oxadiazines), cyperméthrine (pyréthriinoïde)) (Gao et al., 2018). Des études plus générales portant sur l'annotation de protéines cuticulaires ont aussi mis en évidence le rôle qu'ont ces protéines dans les phénotypes résistants via la comparaison d'expression génique entre souches sensibles et résistantes, puis validation via qPCR (Chen & Hou, 2021). La même démarche a également été utilisée pour préciser l'annotation de protéines cuticulaires et leur implication dans la résistance à des insecticides via une approche de transcriptomique comparative entre individus contrôles et individus exposés à des pesticides chez *Spodoptera frugiperda* (Zhu et al., 2021).

#### d. Cas des résistances à plusieurs substances actives

Au cours de la saison, les populations de ravageurs vont bien souvent subir de multiples traitements avec différentes substances actives. Ces pressions de sélections peuvent aboutir à la sélection d'individus résistants à plusieurs substances actives. Il est important de noter que plusieurs substances actives peuvent avoir des modes d'action similaires. C'est d'ailleurs sur cette base qu'ont été établies différentes classifications dont celle de l'IRAC (Sparks & Nauen, 2015) ou celle du réseau R4P (R4P, 2018). Certains mécanismes de résistance peuvent conférer une résistance à l'ensemble des substances actives appartenant à un mode d'action. Un exemple bien connu est celui de la RLC aux pyréthriinoïdes. Cette famille de pesticides cible les canaux sodium codés par le gène *para*. Une mutation présente sur ce gène peut entraîner des résistances à plusieurs substances pyréthriinoïdes (Scott, 2017).

La résistance à plusieurs substances actives peut également concerner différentes familles chimiques. Selon les bases génétiques à l'origine de cette poly-résistance, on parle alors soit :

- D'une **résistance croisée**, où un événement génétique unique sera responsable de la résistance à plusieurs substances actives. Un exemple de résistance croisée peut être pris avec CYP6G1 chez *D. melanogaster*, qui confère une résistance au DDT et à l'imidaclopride (néonicotinoïde) ; deux insecticides aux modes d'actions différents (Joußen et al., 2008).
- D'une **résistance multiple**, où une accumulation de mécanismes vont conférer les différentes résistances. Un exemple de résistance multiple a par exemple était décrite chez *M. domestica*, où une série de mutations sur différentes acétylcholine-estérases vont engendrer des résistances à plusieurs organophosphorés (dichlorvos, azamethiphos et malaoxon) et un carbamate (bendiocarbe) (Walsh et al., 2001). La résistance multiple peut être la conséquence d'accumulation de RLC, de RNLC, ou bien d'une combinaison des deux.

Chez les insectes ravageurs, la résistance à plusieurs substances actives est généralement causée par une résistance croisée, elle-même due à une RNLC (Li et al., 2007; Oakeshott et al., 2005). En effet, le spectre de résistance des mécanismes de RNLC n'est pas forcément spécifique à un mode d'action, et peut être plus imprévisible : une pompe à efflux ou une



enzyme de détoxification peuvent avoir la capacité d'excréter ou de métaboliser plusieurs molécules de substances actives différentes.

### III. Bases génétiques des résistances et génotypage

Connaître les bases génétiques des résistances présente à la fois des intérêts théorique et pratique. D'un point de vue théorique, l'identification des polymorphismes responsables des phénotypes de résistance permet de mieux comprendre les trajectoires évolutives en jeux dans l'adaptation des individus à la pression de sélection. D'un point de vue pratique, avoir identifié les mutations liées au phénotype de résistance permet le développement d'outils de détection et de surveillance des résistances au champ à l'aide d'outils moléculaires. Comme évoqué précédemment, les RLC sont la conséquence d'une modification de la cible de l'insecticide (ou de son expression). Dans la majorité des cas, la cible étant connue, il est relativement simple d'identifier les polymorphismes associés à la résistance. Mais en ce qui concerne la RNLC, la diversité potentielle des mécanismes sous-jacents complique grandement l'identification des gènes impliqués dans le phénotype de résistance. L'identification de ces bases génétiques est donc un enjeu essentiel, aussi bien d'un point de vue scientifique qu'appliqué.

#### a. Modifications génomiques à l'origine de résistances non liées à la cible

Pour les RNLC, les modifications génomiques peuvent avoir des impacts à deux niveaux : à un niveau qualitatif ou à un niveau quantitatif.

L'existence de polymorphisme dans les régions codantes va pouvoir modifier qualitativement une enzyme de détoxification ou permettre d'acquérir une nouvelle fonction. Une mutation va ainsi pouvoir permettre à une enzyme d'avoir une meilleure efficacité vis-à-vis de la molécule à dégrader. Cela a pu être montré chez *Lucilia cuprina*, où une mutation dans une CbE permet d'augmenter l'hydrolyse d'organophosphorés de 33 à 55 fois chez les insectes porteurs de cette mutation (Devonshire et al., 2003; Russell et al., 2011). Un gain de fonction suite à une mutation a également été montré chez *Nilaparvata lugens* où un CYP6ER1 mutant a permis d'acquérir une résistance à l'imidaclopride (un néonicotinoïde) (Zimmer et al., 2018, p. 201).

Des phénomènes d'amplification génique ou de polymorphisme dans les régions promotrices vont, eux, pouvoir provoquer un changement dans les niveaux d'expression des gènes impliqués dans de la RNLC. L'amplification génique va être causée par une augmentation du nombre de copie de gènes suite à des duplications. Chez *Culex pipens*, l'amplification des

estérases Est2 et Est3 permettent d'atteindre un niveau d'expression de ces enzymes jusqu'à 100 fois supérieur chez des individus résistants à des organophosphorés (Rooker et al., 1996). Une ou plusieurs mutations dans les régions promotrices d'enzymes de détoxification vont également impacter les niveaux d'expression de ces gènes. C'est le cas chez le carpocapse des pommes, où 3 SNP dans la région promotrice de CYP6B2 vont permettre à une souche résistante à l'azinphos-méthyl (un organophosphoré) d'augmenter de 200 fois son niveau d'expression, mais également à une souche résistante à la deltaméthrine (un pyréthriinoïde) d'augmenter de 70 fois son niveau d'expression (Wan et al., 2019).

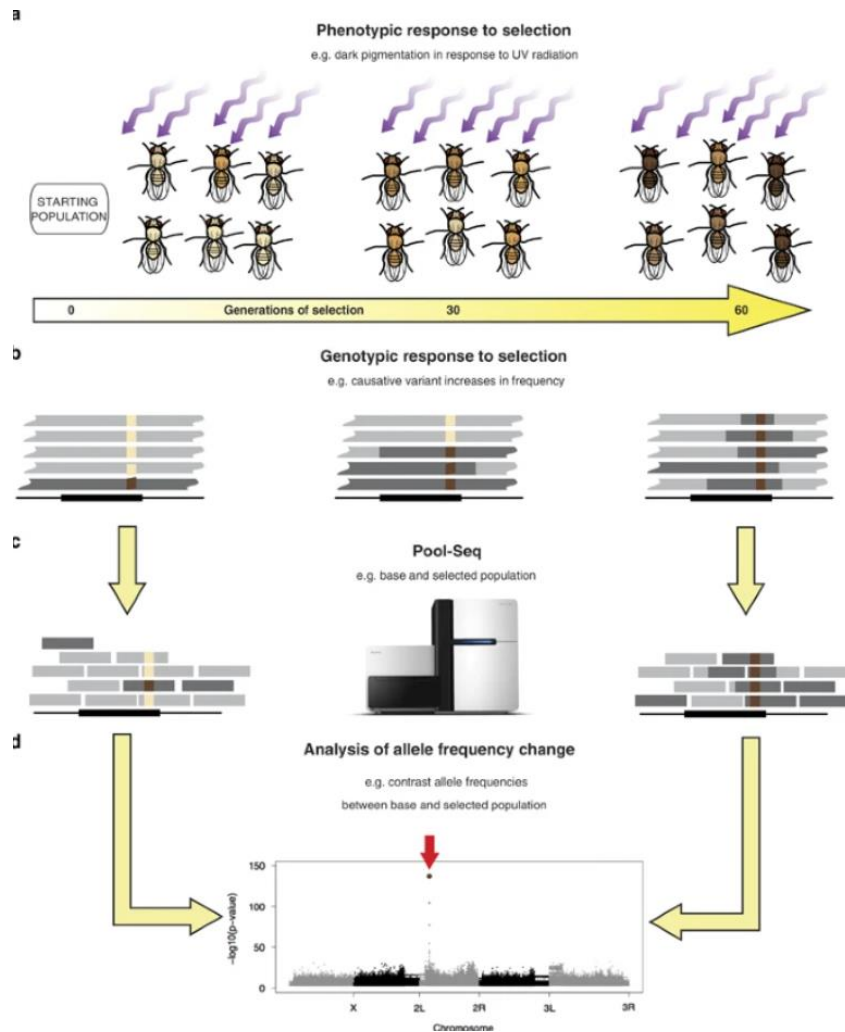
#### b. Méthodes pour identifier les bases génétiques de la résistance

Afin d'identifier les bases génétiques causant les résistances, il est nécessaire de faire le lien entre le génotype de l'individu résistant et le phénotype observé. Pour cela, différentes méthodes peuvent être suivies.

##### i. Approches pour identifier des polymorphismes génétiques associés aux phénotypes

L'identification des bases génétiques de traits phénotypiques quantitatifs est un défi complexe qui nécessite de combiner des informations phénotypiques précises avec des données de génétique les plus exhaustives possibles. Au cours du temps et avec l'évolution des techniques (en particulier de biologie moléculaires) et des connaissances, différentes approches ont été utilisées.

*Stratégie d'évolution et reséquençage ('evolve & resequence experiments')*



**Figure 5 :** Schéma illustrant une expérimentation d'évolution et reséquençage, d'après Schlötterer et al., 2015.

Cette première approche va pouvoir se faire à partir de populations naturelles présentant des phénotypes d'intérêts, en la faisant évoluer sous conditions contrôlées. Une évolution expérimentale consiste en l'exposition pendant un nombre donné de générations, une population (ou une souche d'organisme pour les microorganismes) dans un nouvel environnement contraignant (Kawecki et al., 2012). La mise en place d'évolution expérimentale couplée à des méthodes de séquençage (études d'évolution et de reséquençage – Evolve & Resequencing studies) va ainsi permettre de découvrir les déterminants génétiques derrière l'adaptation des individus à l'environnement contraignant (Long et al., 2015). Ce type de méthode a été montré comme particulièrement efficace pour identifier des loci contribuant à l'adaptation des individus ainsi que la trajectoire évolutive de ces derniers, via approches expérimentales et modélisation (Kofler & Schlötterer, 2014; Orozco-terWengel et al., 2012;

Schlötterer et al., 2014; Turner et al., 2011). Il est donc d'autant plus pertinent d'utiliser ce type d'approche dans un cadre d'identification des mécanismes génétiques liés à de la résistance aux insecticides ou des marqueurs associés directement aux résistances, comme cela a déjà été suggéré et effectué dans différentes études (Cattell et al., 2020; Fritz, 2022; Wybouw et al., 2019).

Les études basées sur de l'évolution expérimentale présentent différents avantages. De par le contrôle de l'histoire démographique et des pressions exercées sur les populations expérimentales, elles permettent de lier directement la sélection imposée lors de l'expérience et les changements phénotypiques et génomiques observés (Martins et al., 2014). Cela permet notamment de diminuer les effets confondants et par conséquent de limiter les faux positifs.

Cependant, l'une des limites majeures de ce type d'expérimentation est le fait qu'il est impossible de reproduire fidèlement l'écologie de l'environnement naturel de la population initiale : les conditions contrôlées en laboratoire sont généralement simples et l'expérience est souvent conduite sur un temps relativement court (Bailey & Bataillon, 2016). De plus, pour garder un pas de temps raisonnable lors de ces expériences, la pression de sélection utilisée peut être très forte, voire extrême, ce qui peut amener à des phénotypes ou génotypes n'étant pas observables dans des conditions naturelles (Hoang et al., 2016).

#### *Approches de cartographie QTL et GWAS*

Ces approches correspondent aux scans génomiques d'association. Il va s'agir d'identifier les gènes contrôlant un trait phénotypique d'intérêt via le génotypage de marqueurs répartis sur tout le génome des individus, pour identifier une association entre les génotypes des individus et la valeur de leur phénotype. Les approches utilisées peuvent se faire par de la cartographie de locus à caractère quantitatif (ou QTL, quantitative trait loci), où les individus utilisés vont être issus d'un couple de parents et devront avoir été croisés pour pouvoir délimiter de la façon la plus précise possible la région chromosomique associée au phénotype d'intérêt (Nadeau & Jiggins, 2010; Slate, 2013). Des études d'association pangénomique (GWAS, genome wide association studies) peuvent également être faites. Ici, les individus utilisés doivent provenir de populations différentes et dont les individus auront été caractérisés pour le phénotype de résistance, sans qu'un croisement ne soit nécessaire (Hunter et al., 2013; Stinchcombe & Hoekstra, 2008). Ces approches permettent d'identifier plus ou moins précisément les régions génomiques d'intérêts dans l'étude du trait phénotypique considéré. Le niveau de précision de

la localisation dépend à la fois du nombre de marqueurs utilisés mais aussi de la stratégie choisie et des individus utilisés.

#### *Approche par gènes candidats*

Cette approche repose sur la connaissance *a priori* de gènes impliqués dans les phénotypes de résistance chez des organismes proches phylogénétiquement de l'organisme d'intérêt, pour ensuite pouvoir explorer le rôle de ces gènes. Les gènes candidats sont souvent identifiés en recensant les gènes dans les régions génomiques qui sont associés au phénotype d'intérêt suite à une analyse QTL ou GWAS (Donnelly et al., 2016; Weetman et al., 2018). Après avoir identifié un groupe de gènes candidats, il s'agit de réaliser également une analyse d'association entre phénotypes et génotypes d'individus caractérisés pour le trait d'intérêt, mais cette fois limitée aux seuls gènes candidats et non plus à l'ensemble du génome (comme c'est le cas pour les approches QTL et GWAS).

#### *Approche transcriptomique*

En plus des polymorphismes qui peuvent affecter la structure des protéines, les phénotypes de résistances peuvent être la conséquence de variation d'expression de gènes entre les individus aux phénotypes divergeant (Feyereisen, 1995). Les NGS peuvent également permettre l'étude des variations liées aux profils d'expression et aux mécanismes de régulation, via le séquençage de l'ARN (RNAseq).

Cette méthode va permettre de quantifier puis de comparer l'expression de gènes entre différents individus, d'identifier la présence de polymorphismes ou d'épissage alternatif, en se basant sur le transcriptome entier d'individus (Lowe et al., 2014). Différents types d'ARN peuvent également être analysés : des ARN codants, avec des ARN messagers (mRNA), ou des ARN non codants : avec des ARN longs non codants (lncRNA) ou des micro ARN (miRNA) (Quian et al., 2019 ; Wang et al., 2010).

Les données de RNAseq peuvent aussi être utilisées pour détecter la présence de polymorphismes dans les régions codantes du génome. Une mutation présente dans les transcrits peut avoir, selon son type, un impact plus ou moins fort sur la protéine finale. Des études utilisent ainsi ces données afin d'identifier des polymorphismes, sans avoir besoin de

passer par du séquençage génomique (DNaseq) avec des approches de GWAS par exemple (Lopez-Maestre et al., 2016 ; Piskol et al., 2013).

Les données produites lors d'une expérimentation de RNAseq peuvent également permettre d'identifier des mécanismes de régulation via l'identification du rôle des ARN non codants. En effet, les ARN non codants ont déjà été montrés comme jouant un rôle dans la régulation d'enzymes impliquées dans les voies de détoxification via une stabilisation de leur ARN messenger chez de nombreux insectes (Zhang et al., 2021 ; Zhu et al., 2020 ; Zhu et al., 2021).

## ii. Validation fonctionnelle

Pour s'assurer du lien de causalité entre l'expression différentielle d'un gène, ou la modification d'une protéine et un phénotype de résistance, il est nécessaire d'ajouter des étapes de validation fonctionnelle (Homem, & Davies, 2018). Il peut s'agir de mesures *in vitro* de l'activité de la protéine en présence d'insecticide s'il s'agit d'un gène codant pour une enzyme métabolisant l'insecticide (Riveron et al., 2013), de changement d'expression via la méthode GAL4/UAS (Pang et al., 2016), de *silencing* via ARN interférant (Bautista et al., 2009) ou de méthodes d'édition de génome comme CRISPR-Cas9 (Douris et al., 2020).

## IV. Méthodes pour caractériser et surveiller les résistances aux insecticides

### a. Méthode de phénotypage : Bioessais par ingestion / par contact

Pour assurer une gestion des ravageurs efficace dans les territoires, pouvoir diagnostiquer les résistances avant l'application d'un traitement est un enjeu essentiel. En effet, avoir des traitements restant les plus efficaces possibles sans sélectionner des résistances déjà présentes dans les populations est indispensable pour une gestion durable des ravageurs dans le temps. Différentes méthodes ont pu être utilisées pour détecter les résistances et en étudier la dynamique et l'émergence afin de les diagnostiquer. Elles se sont tout d'abord basées sur les phénotypes des individus, en les caractérisant en présence de pesticides.

La méthode de détection des résistances historiquement utilisée est la caractérisation phénotypique de la résistance d'un individu ou d'une population par l'exposition à la substance active (ou au produit de protection des plantes). On parle de bioessais. Ceux-ci permettent la détermination de l'intensité des résistances existantes et l'estimation de la fréquence des phénotypes résistants au sein d'une population, sans en identifier le mécanisme à l'œuvre. L'intensité des résistances peut se calculer par comparaison avec une souche sensible de référence, via l'établissement de rapports de résistances. Ces rapports de résistance correspondent au ratio entre les concentrations de pesticide requises pour avoir la même efficacité pour des populations résistantes ainsi que pour une population sensible de référence (sous des conditions contrôlées identiques (R4P Network, 2016).

En ce qui concerne les insectes, les bioessais peuvent être divisé en deux catégories : les bioessais par ingestion ou par contact.

Les bioessais par ingestion consistent à contaminer un milieu nutritif (ou une feuille de la plante-hôte du ravageur) par une ou différentes concentrations d'insecticide que le ravageur va pouvoir ingérer. Les bioessais par contact vont consister en l'application de pesticide directement sur les individus (par application topique ou par aspersion) ou par contact tarsal en mettant les insectes en contact avec un support sur lequel a été appliquée la substance active. Dans ces bioessais, la mortalité de la population d'intérêt est comparée à celle d'une



population sensible de référence (pour laquelle 100% des individus ont été considérés comme sensibles à la substance active testée).

La comparaison avec une population sensible de référence peut se faire de deux manières différentes (R4P Network, 2016) :

- Le test d'une gamme de doses permettant d'établir une courbe dose-réponse, afin de déterminer le niveau de résistance de la population.
- Le test de mortalité à une dose discriminante qui va permettre de détecter la fréquence d'individus résistants dans une population. Cette dose discriminante correspond à une concentration d'insecticide empêchant le développement de tout individu considéré comme sensible. Un individu réussissant à se développer sous cette dose est ainsi considéré comme résistant. Elle nécessite cependant d'être établie *a priori* avant d'effectuer le test de mortalité.

Ces bioessais sont utilisés au laboratoire pour pouvoir détecter tous les types de résistances même ceux encore inconnus, car il ne nécessite pas la connaissance des mécanismes sous-jacents impliqués. Ils peuvent être utilisés lors de campagnes de surveillance pour suivre la propagation des résistances sur un territoire basées sur du phénotypage (Reyes & Sauphanor, 2008; Siegwart & Maugin, 2013).

#### b. Dosages biochimiques

Les dosages ou essais biochimiques consistent à quantifier, chez un individu, les activités de certaines familles d'enzymes impliquées dans les résistances (Brogdon, 1989). Ils peuvent en cela permettre d'identifier certains des mécanismes à l'œuvre derrière les phénotypes résistants.

Les mesures d'activité enzymatiques ont été mises au point en se basant sur l'utilisation de substrat spécifique à chaque famille d'enzyme connues pour être impliquées dans la détoxification (MFO, CbE et GST) (Nauen et al., 2002; Reyes et al., 2007; Ullrich & Weber, 1972).

D'autres méthodes peuvent également être employées comme l'électrophorèse sur gel d'acrylamide couplée à un Western-Blot, pour pouvoir caractériser les protéines impliquées dans les phénotypes résistants. Les exemples d'utilisation de cette méthode dans la caractérisation d'estérases sont nombreux. Cela a été particulièrement utilisé dans l'étude des

mécanismes de la résistance à la cyperméthrine et au thiodicarbe chez *Heliothis virescens*, dans la résistance au parathion chez *Schizaphis graminum* et dans la résistance au méthyl-parathion chez *Diabrotica virgifera virgifera* (Goh et al., 1995; Siegfried et al., 1997; Zhou et al., 2005).

Les méthodes basées sur du phénotypage sont donc idéales pour caractériser une population et la substance active à laquelle elle est résistante. En effet, elles ne nécessitent généralement que des équipements de laboratoire communs, peuvent être réalisées sans avoir d'*a priori* sur les mécanismes de résistance impliqués dans les phénotypes résistants et peuvent détecter une résistance quel qu'en soit le mécanisme la causant. C'est l'approche la plus simple et directe, mais elle ne permet pas une compréhension des mécanismes derrière les phénotypes résistants. Elle permet cependant de détecter efficacement des résistances émergentes dans des populations naturelles.

En effet, tels quels, ces bioessais ne permettent pas d'identifier le (ou les) mécanisme(s) responsable(s) du phénotype de résistance de l'individu testé. Cependant, s'ils sont couplés à un inhibiteur d'une famille d'enzymes impliquées dans les résistances, ils peuvent indiquer si la résistance présente est de type métabolique ou non (R4P Network, 2016). Pour cela, un ou des inhibiteurs spécifiques, comme le piperonyl butoxide, le S, S, S-tributyl phosphorotrithioate et le maléate de diéthyle pour les MFO, CbE et GST, respectivement (Buès et al., 2005), sont mélangés à l'insecticide pour voir s'il y a une synergie.

De plus, leur mise en place peut être fastidieuse, et leur faisabilité dépend de nombreux facteurs. Ils possèdent de nombreux inconvénients liés principalement à la nécessité d'avoir des insectes vivants et en grande quantité à un stade de développement homogène (engendrant un coût et un temps de mise en place potentiellement élevés). De plus, ils ne permettent de n'avoir des résultats que pour une substance active à la fois et peuvent ne pas être très précis lorsque la fréquence des phénotypes résistants au sein d'une population est faible ou qu'une résistance est émergente. Ils nécessitent également d'avoir une population sensible correctement caractérisée afin de pouvoir faire des comparaisons fiables entre populations.

### c. Méthodes moléculaires pour détecter les résistances

Après identification des bases génétiques conférant des résistances aux individus (voir ci-dessus), différentes méthodes peuvent être utilisées pour détecter les résistances dans les populations de terrain par l'utilisation d'outils moléculaires. Ces analyses peuvent se faire à l'échelle de l'individu ou à l'échelle d'une population.

#### i. Identifier des mutations ponctuelles chez un individu ou dans une population

Comme évoqué précédemment, les résistances peuvent être dues à des mutations ponctuelles, qu'elles soient sur la cible de l'insecticide ou au niveau de promoteurs. Il existe ainsi différentes méthodes qui peuvent être appliquées pour détecter ces mutations dans les individus présentant des phénotypes résistants.

#### *PCR RFLP*

La PCR-RFLP se base sur la variation d'un nucléotide au niveau d'un site de coupure d'une enzyme de restriction. Après extraction de l'ADN, celui-ci est digéré par une enzyme, et les fragments obtenus sont séparés les uns des autres par électrophorèse sur gel d'agarose. Une sonde marquée est alors utilisée pour révéler certains fragments d'ADN, ce qui permet de déduire des différences de nucléotides entre les séquences étudiées (Reshma et al., 2017).

#### *KASP*

La Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) repose sur l'utilisation de sondes spécifiques lors d'une PCR. Ces sondes comprennent 3 amorces, 2 étant allèles spécifiques (permettant de se lier à la région du SNP d'intérêt) chacune ayant un fluorochrome différent associé et la 3<sup>e</sup> étant commune. L'amplification spécifique de chaque allèle est alors couplée à une émission de fluorescence particulière, permettant de détecter rapidement les allèles présents chez l'individu.

#### *Séquençage Sanger*

Après une étape d'amplification de la cible à génotyper, le fragment d'intérêt va pouvoir être séquencé. L'utilisation par la suite d'une PCR va permettre d'augmenter la quantité d'ADN de la zone à séquencer avant séquençage. Le séquençage va ensuite pouvoir se faire en utilisant la quantité d'ADN amplifiée via la méthode développée par Sanger (Sanger et al., 1977). Cette méthode est cependant ancienne et ne permet de ne séquencer que de façon individuelle. Elle

n'est donc pas recommandée dans des expériences en grandes dimensions ou lors de screenings à grande échelle.

### *Séquençage de nouvelle génération (NGS)*

Avec l'arrivée du séquençage de nouvelle génération (NGS), des méthodes plus rapides et plus efficaces de détection et d'étude des résistances ont pu être mises en place. Ce type de séquençage haut-débit permet notamment de travailler sur un grand nombre d'individus, tout en diminuant le nombre de réactions et le nombre d'analyses à effectuer pour traiter les données, ainsi que d'avoir un coût beaucoup plus faible que pour un séquençage Sanger (Behjati et al., 2013). Cela permet également d'enlever la contrainte liée au faible nombre de gènes pouvant être séquencés via la méthode Sanger. Même si cette méthode devient plus accessible, son coût reste un frein dans le contexte de la surveillance des résistances. Ainsi, des approches autres que le séquençage de génome entier d'individus peuvent être envisagées, avec par exemple le séquençage en pool ou du séquençage ciblé. Le séquençage en pool s'effectue en regroupant l'ADN de multiples individus d'intérêt et de les séquencer, plutôt que de faire plusieurs séquençages individuels. Du séquençage ciblé peut également être fait, via capture et hybridation de séquence ou séquençage d'amplicons, où des sondes vont être utilisées pour délimiter une région spécifique à séquencer (Collins et al., 2022). Ces approches peuvent également être combinées entre elles.

#### ii. Quantifier les copies de gènes ou variations d'expression chez un individu

Une autre cause des phénotypes résistants peut être un changement dans l'expression génique d'enzymes impliquées dans la détoxification. Pour détecter ces variations, différentes méthodes peuvent être utilisées.

### *qPCR*

Cette méthode va permettre de quantifier le nombre d'amplicons générés par les différents cycles de PCR suite à un marquage fluorescent (Kubista et al., 2006). La quantité d'ADN va donc pouvoir être suivie durant la réaction et ainsi permettre d'estimer selon le nombre de cycles nécessaires à atteindre un certain seuil de fluorescence s'il y a eu une amplification génique.

### *RT-qPCR*

La RT-qPCR permet d'avoir une approche quantitative de l'expression génique en ayant comme matrice de départ de l'ARN messager. Après une transcription inverse permettant d'obtenir de l'ADN complémentaire, elle va suivre le même protocole que la qPCR, et ainsi pouvoir mesurer la quantité d'ADN obtenu depuis l'ARN ciblé (Taylor et al., 2010). Cette méthode est la plus couramment utilisée pour mesurer le niveau d'expression des gènes d'intérêt entre les individus testés et les individus de référence sans passer par des méthodes de NGS.

Toutes ces méthodes permettent ainsi une détection robuste des marqueurs associés aux résistances dans des populations naturelles. Premièrement, par rapport à des approches basées sur du phénotypage, elles requièrent moins de temps. De plus, un des avantages majeurs de ces méthodes est que leur sensibilité est très haute (Van Leeuwen et al., 2020). Également, le séquençage nouvelle génération permet un traitement rapide des échantillons, en réduisant considérablement le temps nécessaire par rapport au séquençage Sanger. Le séquençage en pool permet également de réduire les coûts, par rapport à plusieurs séquençages individuels.

Cependant, la contrainte majeure de ces méthodes est qu'il faut avoir identifié au préalable le mécanisme génétique conférant la résistance. C'est donc une démarche *a priori* qui est conduite, amenant également la possibilité de ne pas détecter un marqueur pourtant associé à la résistance, car inconnu. En ce qui concerne les méthodes impliquant un séquençage haut débit, une de leurs limites est liée à l'acquisition et au traitement des données obtenues. En effet, en plus du coût qu'elles peuvent engendrer, il est nécessaire de conduire des analyses bio-informatiques pour pouvoir analyser les données. Pour le séquençage en pool, il est également à noter qu'on ne peut plus accéder aux génotypes individuels.

Plus généralement, c'est la robustesse des marqueurs moléculaires choisis qui va être d'une grande importance dans l'efficacité des méthodes de détection moléculaires. D'après Van Leeuwen et al., 2020, l'intensité de l'association du marqueur avec le phénotype résistant (*i.e.* à quel point le phénotype est déterminé par le seul marqueur), sa distribution géographique et son universalité vont être les facteurs principaux jouant sur l'efficacité de la détection.

## V. Le carpocapse des pommes, *Cydia pomonella*

### a. Généralités biologiques et physiologiques

Le carpocapse des pommes, *Cydia pomonella* (L.) est un Lépidoptère appartenant à la famille des *Tortricidae*. Les adultes mesurent de 15 à 22 mm, et ont une coloration caractéristique par rapport aux autres *Tortricidae*, avec des ailes gris-cendré avec un spéculum à fond brun.

Le carpocapse est considéré comme le principal ravageur des vergers de pommiers et poiriers au niveau mondial, mais peut également se développer sur d'autres plantes hôtes telles que les noyers, et les abricotiers. *C. pomonella* est originaire de la région d'Asie centrale et son aire de distribution a évolué conjointement avec celle du pommier. Cette espèce est actuellement présente sur tous les continents (Thaler et al., 2008).

Leur durée de vie est dépendante de la température (Stoekli et al., 2012) et leur cycle biologique peut être découpé en 2 phases distinctes : une phase sédentaire (sous forme de larve) et une phase de dispersion (sous forme de papillon). Après la ponte des papillons sur les feuilles des pommiers et les rameaux proches des fruits, les œufs vont incuber pendant une période allant de 1 à 3 semaines. Dès leur éclosion, les chenilles se déplacent très rapidement, avec pour objectif d'atteindre et pénétrer les fruits. Les larves peuvent ainsi chercher et essayer de pénétrer un fruit pendant 2 à 4 jours. Après avoir réussi à percer la peau du fruit, elles vont creuser une galerie allant jusqu'aux pépins de la pomme. Les larves ayant un comportement cannibale entre elles, une seule larve va se développer par fruit. Le développement jusqu'au 5<sup>ème</sup> stade larvaire (L5) se déroule à l'intérieur du fruit et dure entre 20 et 30 jours. À la fin de leur développement, les larves L5 vont quitter le fruit pour aller se loger dans l'écorce de l'arbre et former leur cocon (Audemard, 1991). Après émergence, les adultes vont se reproduire et se disperser. Il a été estimé que les adultes avaient la capacité de voler jusqu'à une distance de 11km de leur verger d'origine (Mani & Wildbolz, 1977).

Au cours d'une année, le carpocapse réalise entre une et quatre générations, selon le climat et la plante-hôte. À la fin de la saison estivale, les larves L5 entrent en diapause après avoir tissé un cocon dans l'écorce de l'arbre ou dans le sol. C'est cette diapause qui va permettre au carpocapse d'ajuster son cycle de vie selon les conditions environnementales de disponibilité de ressources et de température (Audemard, 1991).

Le carpocapse peut engendrer jusqu'à 100% de pertes de la production fruitière dans des vergers non traités (Beers et al., 2003). Les fruits attaqués par le carpocapse au début de leur croissance tombent généralement au sol. Dans le cas contraire, le fruit endommagé ne pourra être commercialisé.

Malgré son statut de ravageur d'une importance majeure, jusqu'à récemment peu de ressources relatives à la génomique du carpocapse étaient disponibles. En 2019, un consortium international a permis de séquencer et mettre à disposition une première version du génome du carpocapse (Wan et al., 2019). Son génome mesure 772.89 Mb, avec 27 autosomes et un système sexuel en ZW, et 17.184 gènes qui ont été prédits.

#### b. Méthodes de lutte actuelles

Les insecticides de synthèse ou naturels, la confusion sexuelle, la lutte biologique par acclimatation ou conservation, l'utilisation d'organismes entomopathogènes, la lutte autocide ou la lutte physique permettent de lutter contre *C. pomonella*. Ces différents moyens de lutte sont souvent utilisés de manière combinée ou en alternance durant la saison de production des pommes.

##### i. Insecticides (synthétiques et naturels)

L'une des méthodes les plus utilisées à travers le monde pour lutter contre le carpocapse des pommes est la pulvérisation d'insecticides en vergers. Différentes familles de molécules chimiques peuvent être actuellement utilisées, selon différentes méthodes de pulvérisation en vergers (Tableau 1).

Famille chimique	Substance active
Pyréthroïdes	Lambda-cyhalothrine
	Deltaméthrine
Organo-phosphorés	Phosmet
Diamides	Chlorantraniliprole
Avermectines	Emamectine benzoate
Spinosynes	Spinosad
Phénoxyphényléthers / Benzohydrazides	Fénoxycarbe
	Tébufénozide
Micro-organismes	Virus de la granulose ( <i>Cydia pomonella</i> granulovirus CpGV)

**Tableau 1** : Substances actives utilisées contre *C. pomonella*

### 1. Pyrétroïdes

Les pyrétroïdes sont des dérivés des pyréthrine (issues du chrysanthème). Les pyrétroïdes sont basés sur une forme synthétique beaucoup plus stable et rémanente des pyréthrine naturelles, qui elles sont très sensibles à la lumière et se dégradent rapidement. Cette famille d'insecticides est l'une des plus anciennes existantes et sont encore utilisées contre de nombreux ravageurs. De nombreuses molécules appartiennent à cette famille, comme par exemple la deltaméthrine, la perméthrine ou la lambda-cyhalothrine. Ils agissent en bloquant des canaux sodium voltage dépendants de l'axone en position ouverte. Ceci ne permet donc pas à l'axone de se repolariser pour pouvoir recevoir un nouveau signal nerveux. Cela entraîne une dépolarisation permanente des neurones, qui conduit à une paralysie de l'organisme. Leur action s'effectue au niveau des canaux sodium codés par le gène *para* (Williamson et al., 1993).

### 2. Diamides

C'est une famille de substance qui est relativement récente, ayant été découverte à la fin des années 1990. La découverte du flubendiamide en 1998 par Nihon Nōyaku K.K. (Katsuhira et al., 2006), un composé qui cible de manière très spécifique les lépidoptères et est peu phytotoxique (Tohnishi et al., 2005), a orienté les recherches de nouveaux composés dérivé de ces molécules et créant ainsi la famille des diamides. Les diamides agissent sur l'homéostasie du calcium en se fixant aux récepteurs à ryanodine (codés par les gènes *RyR*) et libèrent du



calcium depuis les compartiments intracellulaires situé dans le réticulum endoplasmique, cela induisant une contraction musculaire. Elles n'ont, de ce fait, pas d'effets phytotoxiques et ciblent très spécifiquement les lépidoptères (à l'image du flubendiamide).

### 3. Spinosynes

Cette famille d'insecticides est composée de toxines produites par la bactérie actinomycète *Saccharopolyspora spinosa*. Vingt formes existent à l'état naturel et plus de deux cent formes ont pu être synthétisées. Les spinosynes commercialisées sont composées de mélanges de métabolites produits par *S. spinosa*, majoritairement de spinosynes A et D ou J et L (Sparks et al., 2012). Leur mode d'action, qui n'est pas totalement élucidé, se fait via leur fixation sur des récepteurs nicotiniques à acétylcholine (naChR) et les récepteurs GABA de l'insecte conduisant à une paralysie de l'organisme.

### 4. Le virus de la granulose : *Cydia pomonella GranuloVirus (CpGV)*

Un autre insecticide naturel est également utilisé contre le carpocapse : le virus de la granulose (CpGV). C'est un virus entomopathogène, appartenant à la famille des Baculovirus, qui est très spécifique à cette espèce d'insecte (Sauer et al., 2017). Après ingestion par une larve, le virus va se multiplier dans la larve et causer sa mort en 4 à 6 jours. Depuis les années 1980, différentes formulations composées de différents mélanges d'isolats viraux sont utilisées en vergers.

### 5. Autres molécules insecticides utilisées contre *C. pomonella*

D'autres molécules sont utilisées dans la lutte contre le carpocapse, notamment les avermectines ou de molécules agissant comme régulateurs de croissance. Les premières sont issues d'une bactérie, *Streptomyces avermitilis*, et se fixent au niveau des récepteur synaptiques GABAergiques et le bloquent en s'y fixant définitivement.

Les régulateurs de croissance agissent sur le système de formation de la cuticule, en jouant sur les mues des insectes. Ils peuvent affecter la mue nymphale (mimétiques ou inhibiteurs de l'hormone juvénile) ou plus généralement en accélérant la mue (analogues d'ecdysone). Ces derniers ont un spectre d'action très réduit, mais n'ont pas de très hauts niveaux d'efficacité, mais peuvent être utilisés conjointement avec d'autres substances actives.

ii. Méthodes de lutte alternatives aux insecticides contre *C. pomonella*

*Confusion sexuelle*

Une autre des méthodes les plus répandues pour réguler les populations de carpocapse est la confusion sexuelle. Elle consiste en la mise en place de diffuseurs d'analogues synthétiques de phéromones émises par les femelles carpocapses. La saturation de l'air en phéromones va perturber l'orientation des mâles vers les femelles, réduisant les probabilités de rencontre entre les individus. Cela a pour effet une diminution du succès reproducteur du carpocapse et entraîne, à terme, une diminution du nombre d'individus au cours des générations.

*Lutte biologique*

Différentes méthodes de lutte biologique sont utilisées contre le carpocapse, notamment la lutte biologique se basant sur ses ennemis naturels, qu'ils soient des prédateurs ou des parasitoïdes, indigènes ou exotiques. Ici, il va être question d'augmenter les populations de ces ennemis, en jouant sur l'environnement (lutte biologique par conservation) ou en introduisant de nouvelles espèces dans le milieu (lutte biologique par acclimatation).

*Lutte autocide*

La lutte autocide (ou technique de l'insecte stérile) correspond au lâcher massif de mâles stériles (élevés en laboratoire) dans les populations naturelles, en ayant pour but de diminuer leur nombre de descendants et donc de réduire la population de ravageurs. Cette méthode de lutte est actuellement utilisée au Canada et en cours de développement en Argentine (Bloem et al., 2005; Botto & Glaz, 2010).

*Lutte physique*

Une méthode de lutte physique est également utilisée en vergers. Il s'agit de filets entourant et protégeant les pommiers. Ces filets ('AltCarpo') permettent de perturber la reproduction des carpocapses via deux mécanismes supposés : en empêchant les femelles de rejoindre leur support de ponte et/ou en empêchant la parade nuptiale des mâles qui s'effectue dans la canopée de l'arbre.



(pyréthrinoides, diamides, organophosphorés, organochlorés ou hormone de croissance) (Bosch et al., 2018; Bouvier et al., 2002; İşci & Ay, 2017; Voudouris et al., 2011). Différentes études ont également pu identifier les gènes liés à ces augmentations d'activité enzymatique. Par exemple, l'implication de CYP6B2 (Wan et al., 2019) dans la résistance à l'azinphos-méthyl et la deltaméthrine (OP et pyréthrinoides) a été mise en évidence grâce à de la validation fonctionnelle via ARN interférent. CYP9A61 a aussi pu être identifié (Yang et al., 2016) comme conférant une résistance à différents substances actives : lambda-cyhalothrine et deltaméthrine (pyréthrinoides), chlorpyrifos-ethyl (organophosphoré), carbaryl (carbamate) et imidaclopride (néonicotinoïde).

Une augmentation de l'activité des GST a aussi été décrite, provoquant une résistance à des pyréthrinoides et des organophosphorés (Bouvier et al., 2002; Liu et al., 2014; Reyes et al., 2007; Rodríguez et al., 2010; Voudouris et al., 2011). Différents gènes codant pour des GST ont été décrits comme étant impliqués lors de la métabolisation de pyréthrinoides, avec plus particulièrement CpGSTe3, CpGSTd3, CpGSTd4 (Wei et al., 2013) et CpGSTd1 (Yang et al., 2016; Zhang et al., 2016) causant une résistance à la lambda-cyhalothrine, mais leur validation fonctionnelle n'a pas encore été faite.

Enfin, une augmentation de l'activité des CbE a aussi été décrite chez des populations résistantes à des organophosphorés et des carbamates (Bush et al., 1993; İşci & Ay, 2017; Reyes et al., 2007; Rodríguez et al., 2010). Un gène codant pour une CbE a été identifié dans la métabolisation de plusieurs substances actives : CpCE-1 (Yang et al., 2016). Il est impliqué dans la métabolisation de différents organophosphorés (methomyl, chlorpyrifosethyl), plusieurs pyréthrinoides (deltaméthrine, cyperméthrine, lambda-cyhalothrine), un néonicotinoïde (imidaclopride) et un carbamate (acephate). Ici, une validation *in vitro* a été faite en exprimant CpCE-1 chez *Escherichia coli* dans des conditions où ces substances actives étaient présentes.

Enfin, contrairement à d'autres Lépidoptères (He et al., 2012; Wilding, 2018), seulement quelques mutations affectant l'activité de ces enzymes ont été décrites. Seuls Wan et al., 2019 ont pu montrer que la surexpression de CYP6B2 était associée à 3 mutations présentes dans sa région promotrice, cela entraînant des augmentations d'expression dans 2 souches résistantes : une souche résistante à l'azinphos-méthyl (où CYP6B2 était exprimé 100 fois plus que dans une souche sensible) et une souche résistante à la deltaméthrine (où CYP6B2 était exprimé 70 fois plus que dans une souche sensible).

## VI. Problématique

La meilleure compréhension des bases génétiques des résistances aux insecticides des ravageurs des plantes est à la fois un enjeu scientifique et un enjeu pratique. D'un point de vue académique, l'évolution des résistances en réponse à une pression de sélection anthropique est assimilable à une expérimentation d'évolution expérimentale. L'étude des bases génétiques des résistances dans ce contexte pourraient permettre des avancées significatives dans les connaissances sur le potentiel adaptatif des organismes soumis à des contraintes environnementales fortes. D'un point de vue pratique, la gestion des résistances sur le terrain passe par une détection efficace de celles-ci dans les populations naturelles. Si les méthodes de détection par bioessais permettent un phénotypage quel que soit le (ou les) mécanisme(s) sous-jacent(s) impliqué(s), elles restent lourdes à mettre en place et peuvent, dans certains cas, être imprécises. Il apparaît donc comme primordial d'améliorer les méthodes de détection de résistances, notamment via l'utilisation d'outils moléculaires. Cela implique une connaissance précise des mécanismes impliqués dans les phénotypes résistants.

Dans le cas du carpocapse, les mécanismes et les bases génétiques responsables des résistances restent dans leur globalité méconnus, en particulier lorsqu'entre en jeu des mécanismes de RNLC. Par le passé, les méthodes à dispositions ne permettaient pas la recherche de ce type de mécanismes sur une espèce non model, tel que le carpocapse des pommes. Les outils NGS combinés à des approches d'évolution expérimentale ont ouvert de nouvelles possibilités pour relever ces défis. Dans ce contexte, la problématique générale de ce travail peut se formuler en différentes questions de recherche :

- Quelles sont les bases génétiques impliquées dans la résistance du carpocapse à différentes substances actives au sein d'une même population ?

De cette question peut en découler d'autres :

- Quelle est la part de la détoxification dans une résistance à plusieurs substances actives appartenant à des modes d'actions variés ?
- Quel est le mécanisme derrière le phénotype de poly-résistance observé : une résistance multiple ou une résistance croisée ?

En effet, même s'il a déjà été montré que les RNLC et la détoxification jouent un rôle important dans la résistance du carpocapse à différentes substances actives (Bouvier et al., 2002; Reyes et al., 2007; Rodríguez et al., 2010), peu d'études se sont appliquées à en identifier les déterminants génétiques. De plus, dans le cas de poly-résistance s'ajoute un niveau de complexité, où différentes origines peuvent être possibles : par une résistance croisée (Li et al., 2007; Oakeshott et al., 2005) ou par une résistance multiple (Joußen et al., 2008; Walsh et al., 2001).

L'approche choisie a été de mener une expérimentation d'évolution artificielle en laboratoire, à partir d'une population ayant été caractérisée comme poly-résistante à des substances actives appartenant à différents modes d'action. Trois substances actives ont été choisies (chlorantraniliprole, deltaméthrine et spinosad) afin de créer trois lignées distinctes par l'application de différentes pressions de sélections lors de l'évolution expérimentale. Différentes mesures de phénotypage ont été utilisées pour caractériser les lignées ainsi obtenues et les effets de l'exposition des individus aux insecticides tout au long de l'expérimentation ont été mesurés (Chapitre 1).

Suite à cela, des analyses transcriptomiques (Chapitre 2) ont été menées afin de mettre en lumière les différences de niveaux d'expression géniques et les polymorphismes de transcrits pour chaque lignée résistante. Enfin, des analyses génomiques (Chapitre 3) ont été conduites afin d'identifier les signatures de sélection et les variations de polymorphisme associées aux phénotypes résistants.

D'un point de vue plus appliqué, l'identification de gènes candidats ou de marqueurs liés à la résistance aux insecticides permet d'envisager le développement prochain d'outils moléculaires de surveillance de la résistance au sein des populations de carpocapse des pommes. Ces ressources pourront notamment être utilisées dans des approches NGS, et il sera ainsi possible d'avoir un outil moléculaire robuste permettant une détection à haut-débit et moindre coût (Van Leeuwen et al., 2020), amenant à une meilleure gestion et surveillance des résistances du carpocapse sur le terrain.

# Chapitre 1 – Mise en place de l'expérimentation d'évolution et reséquençage

## I. Introduction

L'étude des bases génétiques de la résistance aux insecticides nécessite un matériel biologique spécifique et caractérisé précisément vis-à-vis de la sensibilité/la résistance aux substances actives d'intérêts. L'objectif de notre approche d'évolution expérimentale a été de créer, à partir d'une population unique, 3 lignées divergentes, chacune sélectionnée avec une substance active différente, afin de pouvoir les utiliser lors d'analyses transcriptomiques et génomiques pour identifier les bases génétiques impliquées dans la résistance du carpocapse à différentes substances actives.

Différents paramètres ont été considérés lors de la conception du design expérimental, pour limiter les biais pouvant impacter nos résultats. D'après Kofler & Schlötterer (2014), dans leur article '*A Guide for the Design of Evolve and Resequencing Studies*', ainsi que d'après la review de Kawecki et al. (2012), portant sur les applications possibles, le design ainsi que les apports et les limites des évolutions expérimentales, il est mis en évidence des facteurs clés à considérer lors de la conception d'une étude d'évolution expérimentale. La taille de population, le nombre de réplicas, le nombre de générations et la diversité génétique de la population initiale sont 4 paramètres de grande importance. Ils vont ainsi avoir un impact sur la sensibilité de la détection de signatures de sélection, notamment entre des loci faiblement et fortement sélectionnés ; et permettent également de réduire le nombre de faux-positifs qui pourraient être détectés dans les analyses subsidiaires.

Ainsi, nous sommes partis d'une population échantillonnée sur le terrain, caractérisée comme résistante à différents insecticides, sur laquelle différents régimes de sélection ont été appliqués.

La première étape a consisté à acclimater la population à nos conditions de laboratoire, avant de démarrer une phase de multiplication, en vue de procéder aux différentes phases de sélection. Le carpocapse des pommes est une espèce complexe à élever en laboratoire (Dyck, 2010), il y a donc eu nécessité de mettre au point une méthode d'élevage ayant des

rendements satisfaisants avant l'application de plusieurs pressions de sélection sur cette population.

Trois insecticides dont les substances actives (chlorantraniliprole, deltaméthrine et spinosad) appartiennent à différentes familles chimiques : les diamides pour le chlorantraniliprole, les pyréthriinoïdes pour la deltaméthrine et les spinosynes pour le spinosad ont été choisis pour appliquer des pressions de sélection séparément et aboutir à la création de 3 lignées filles distinctes à partir de la population du terrain acclimatée. Nous nous sommes basés sur le design de Cattell et al., 2019 : en fin d'expérimentation, chacune des lignées ont été exposées à un gradient de concentration de l'insecticide avec lequel elles ont été sélectionnées, pour créer 3 sous-lignées filles ayant reçu une pression de sélection plus ou moins forte. Au regard de notre objet d'étude et des contraintes expérimentales qui lui sont liées, nous avons décidé de mener notre expérimentation sur 3 répliques par lignée fille avec 3 à 4 générations de sélection au total.

Différentes mesures de phénotypage ont été réalisées au cours de cette longue expérimentation et plus particulièrement lors de la dernière génération de l'expérimentation (bioessais par ingestion et dosage biochimiques d'activité de familles d'enzymes de détoxification) pour caractériser le phénotype des lignées et sous-lignées obtenues. Les données récoltées tout au long de l'expérimentation nous ont également permis d'évaluer les effets sub-létaux de l'exposition aux insecticides, en mesurant l'influence des pesticides sur la durée de développement et le sex-ratio des individus. En effet, l'exposition à des doses de substances actives n'entraînant pas la mort des individus a déjà été montrée comme ayant des impacts négatifs ou positifs sur leur fitness. On peut observer des impacts négatifs sur différentes fonctions physiologiques de l'individu ou sur leur cinétique de développement, ce qui pourrait être causé par des compromis dans l'allocation des ressources au profit de la dégradation de la molécule xénobiotique (Belinato et al., 2016; Kliot & Ghanim, 2012). Un autre exemple, cette fois-ci avec un impact positif, serait le phénomène d'hormèse, où l'exposition à des substances actives va permettre d'améliorer les capacités reproductives et la croissance des individus (Cutler, 2013; Cutler & Guedes, 2017; Guedes & Cutler, 2014).



## II. Objectifs et hypothèses de ce chapitre

Tout d'abord, il a été question de trouver la méthodologie d'élevage la plus optimale en termes de rendement afin de pouvoir mener notre expérimentation d'évolution expérimentale. Pour cela différentes modalités ont été testées afin d'améliorer nos méthodes et diminuer au plus possible la mortalité larvaire et augmenter la fécondité dans notre élevage. En effet, il a pu être montré que la quantité de nourriture disponible pour les larves dès leur éclosion et que le taux d'humidité dans l'environnement de la larve durant tout son développement ont des rôles prépondérants dans la survie et le développement larvaire (Balachowsky, 1966; Dyck, 2010; Guennelon et al., 1981). Également, différentes études ont pu montrer que la reproduction en groupe est plus efficace et stimulante lors de l'accouplement des individus (Borden, 1931; Knight, 2007; Weissling & Knight, 1995). Nous avons donc joué sur ces paramètres dans notre méthode d'élevage pour essayer d'en optimiser au maximum le rendement.

Ensuite, il a fallu mettre en place l'évolution expérimentale. Pour cela, il a été nécessaire de calibrer les différentes pressions de sélection choisies, en calculant les concentrations de substances actives correspondantes. Pour cela, des bioessais ont dû être faits, et les différents paramètres relatifs à leur mise en place ont été décidés (type de méthodologie, stade des individus). Il a également été nécessaire d'estimer les conséquences de l'évolution expérimentale sur nos individus en phénotypant les lignées et sous-lignées créées suite à notre expérimentation. Ainsi, parmi les différentes méthodes de phénotypage possibles en laboratoire (cf. Introduction, IV.), nous avons pu évaluer et identifier laquelle était la plus appropriée suite à une évolution expérimentale.

Enfin, en parallèle de la conduite de l'expérimentation d'évolution expérimentale (et la réussite des différentes phases de sélection), il sera question des effets sub-létaux de l'exposition aux différentes substances actives insecticides qui seront utilisées. Les substances actives n'ayant pas les mêmes caractéristiques, notamment en termes de propriétés toxicologiques ou de rémanence, les effets de chaque substance peuvent ainsi être différents sur le développement des individus, même au sein de lignées résistantes. Pour évaluer la présence et l'impact de ces effets lors de notre expérimentation, nous avons analysé les cinétiques d'émergence dans nos lignées afin d'observer si les différentes substances actives et les concentrations que nous avons appliquées allaient impacter la durée de développement des individus. Nos différentes

hypothèses étaient que : les individus exposés aux insecticides allaient avoir un temps de développement larvaire ralenti, et que ce ralentissement allait être d'autant plus grand que la dose était forte ; et que les modes d'action et/ou la rémanence du produit allaient également impacter les temps de développement des individus.

## III. Matériels et méthodes

### a. Evolution expérimentale

#### i. Populations utilisées dans l'évolution expérimentale

##### 1. Population sauvage initiale

La population sauvage, échantillonnée en 2017, a été phénotypée une première fois en 2018 à l'occasion de la campagne annuelle de surveillance biologique du territoire (SBT) des résistances mise en place par la DGAL pour laquelle PSH réalise des analyses. Elle provient d'un verger de pommiers commercial, situé près de Cavaillon (84), en PACA et a alors été caractérisée comme résistante à de nombreuses substances actives utilisées dans la lutte contre le carpocapse des pommes (*Cydia pomonella GranuloVirus-M*, thiacloprid, deltaméthrine, chlorantraniliprole et phosmet, Table 2). Il a ainsi été décidé de l'échantillonner à nouveau à l'automne 2018. La diapause des larves piégées devant être levée avant la mise en élevage, cette dernière n'a commencée qu'au printemps 2019.

L'échantillonnage sur terrain est réalisé par la pose de « bandes-pièges » faites de carton cannelé autour des pommiers dans les vergers, pour que les larves de 5<sup>e</sup> stade (L5) entrant en diapause s'y établissent et y tissent leur cocon.

##### 2. Souche sensible de référence

La population sensible de référence (SV) est issue d'une population prélevée dans la commune des Vignères (84) à 6 km de la commune de Cavaillon. Elle a été élevée en masse depuis plus de 135 générations au laboratoire. Elle a été caractérisée comme sensible aux différentes substances actives mises sur le marché depuis 28 ans, n'a jamais été exposée à des insecticides et est maintenue en élevage sans aucune pression de sélection.

#### ii. Conditions d'élevage

##### 1. Elevage initial (piluliers, générations 1 à 5)

Après avoir récupéré et dépouillé les bandes-pièges posées sur le terrain, une identification des individus est réalisée. Les individus qui sont visuellement identifiés comme étant des carpocapses des pommes sont placés dans des bandes de carton cannelés propres et mises dans une chambre froide à 4°C durant 4 mois pour lever la diapause des larves. L'induction de la transformation en chrysalide des larves se fait en mettant les bandes cartonnées contenant

les larves telles quelles dans des boîtes en plexiglas en salle d'élevage ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , RH  $45 \pm 5\%$  et 16:8 L:D h). Les papillons sont ensuite collectés et sexés à l'émergence. Ils sont regroupés,

Insecticide	Population	Dose discriminante (DD)	Nb testés sur milieu témoin	Nb de morts sur milieu témoin	Nb testé à la DD	Nb morts à la DD	Mortalité corrigée (%)	KHI2/SS Corr. Yates	Signif.
Phosmet	Sensible	30,3	99	12	24	22	90,52	0,00	-
	Pop. sauvage	30,3	54	12	26	9	15,93	168,14	***
Thiaclopride	Sensible	27,88	99	12	24	23	95,26	0,00	-
	Pop. sauvage	27,88	54	12	23	10	27,33	221,74	***
CpGVM	Sensible	6250	99	12	23	22	95,05	0,00	-
	Pop. sauvage	6250	54	12	29	13	29,06	265,43	***
Chlorantraniliprole	Sensible	3	99	12	24	23	95,26	0,00	-
	Pop. sauvage	3	54	12	26	13	35,71	192,39	***
Deltamethrine	Sensible	0,95	37	3	24	23	95,47	0,00	-
	Pop. sauvage	0,95	55	9	22	10	34,78	184,21	***

**Tableau 2 :** Résultats des bioessais effectués lors de de la campagne annuelle de surveillance biologique du territoire en 2017 sur notre population initiale.

pour la phase de reproduction, dans des bouteilles en plastique vides de différents volumes, coupées à leur extrémités et obstruées par un voile de tissu pour permettre la circulation d'air, dès que 10 mâles et 10 femelles pour une bouteille d'1,5L ou 50 mâles et 50 femelles pour une bouteille de 5L ont été récoltés.

Les femelles déposent ainsi leurs pontes directement à la surface des bouteilles. Des pommes sont placées à proximité des bouteilles pour que les composés volatils qu'elles relarguent stimulent la reproduction et la ponte des carpocapses. Un coton humide est placé dans la bouteille pour maintenir de l'humidité et permettre aux papillons de boire. L'humidité est maintenue dans les bouteilles grâce à une pulvérisation 2 fois par jour d'eau et à un tissu humide posé par-dessus les bouteilles et les pommes (Figure 10).

Au bout de 7 jours, les papillons vivants sont transférés dans une nouvelle bouteille de ponte. Les individus morts sont stockés dans des tubes Falcon remplis d'éthanol à 90% et gardés à 4°C pour analyses génétiques ultérieures.

La bouteille dans laquelle les papillons ont pondu est découpée afin de récupérer les pontes. Les morceaux de bouteille sont mis dans des boîtes rondes (80 mm x 50mm), avec un coton humidifié afin d'obtenir des conditions d'humidité optimale pour l'éclosion des œufs. Elles sont ensuite incubées dans la salle d'élevage ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , RH  $45 \pm 5\%$  et 16:8 L:D h). Après environ 7 jours, les œufs commencent à éclore et les premières larves néonates (stade L1) peuvent être récoltées. Durant le week-end, les boîtes contenant les œufs sont conservées à 11°C pour éviter une surmortalité des larves lorsqu'elles ne peuvent pas être posées sur du milieu.

Les larves des populations naturelles de carpocapse doivent être individualisées lors de leur mise en élevage. En effet, il a été montré que les populations non adaptées aux conditions de laboratoire ont des comportements de cannibalisme (Guennelon et al., 1981). Les larves sont alors prélevées individuellement à l'aide d'un pinceau puis placées une à une dans des piluliers remplis de milieu nutritif.

Le milieu nutritif est préparé à l'aide d'un mélange commercial à base de farine de soja (Stonefly Heliotis Diet, Ward's Science, Rochester, NY, USA) auquel est ajouté de l'eau milliQ et de l'acide acétique. Après la pose des larves, les piluliers sont refermés et posés sur des plateaux, disposés en salle d'élevage. La salle d'élevage a été divisée en 2 paillasses principales.

Les larves vont ensuite faire tout leur développement jusqu'au stade L5 à l'intérieur des piluliers. Les émergences de papillons sont ensuite vérifiées quotidiennement. Dès qu'un nombre minimum de mâles et de femelles est atteint (cf. paragraphe précédent), les adultes sont placés en bouteille de ponte en vue de l'obtention d'une nouvelle génération.

## 2. Elevage pour amplification (tubes, générations 5 à 10)

La technique d'élevage en pilulier induisant une forte mortalité larvaire, il a été nécessaire d'optimiser les méthodes d'élevage à partir de la 4<sup>e</sup> génération d'élevage. Nous sommes donc passés à un élevage en tube au lieu de piluliers.

Après l'éclosion des œufs, les larves de stade L1 sont prélevées à l'aide d'un pinceau et placées individuellement dans un tube rempli de milieu nutritif gélosé (Guennelon et al., 1981).

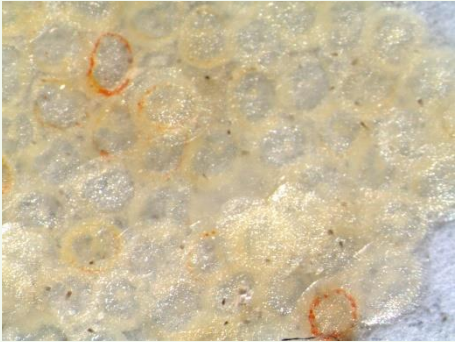
Le passage d'élevage en pilulier à un élevage en tubes a entraîné un changement de type de milieu d'élevage. Le milieu nutritif pour tubes est préparé avec les ingrédients suivants (proportions indicatives pour 1.5L de milieu) : de la farine de maïs (171,9g), du germe de blé (41,9g), de la levure de bière (46,3g), de l'acide ascorbique (6,7g) de la nipagine (2,3g), de l'acide benzoïque (3g), de l'agar (20g) et de l'eau milliQ (1L). Le milieu est ensuite coulé dans des tubes à hémolyse (80x15mm), qui sont stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Les tubes dans lesquels les larves ont été déposées sont bouchés avec du coton pour qu'ils ne sèchent pas mais puissent se ventiler et ne pas moisir. Ils sont ensuite mis dans des boîtes en plexiglas possédant des aérations (30x20x15cm), à raison de 180 tubes par boîte au maximum. Les larves vont ainsi faire tout leur développement jusqu'au stade L5 à l'intérieur des tubes.

Trois semaines après la pose des larves, le bouchon de coton des tubes est enlevé, pour permettre à la larve de stade L5 d'aller faire son cocon au sein de bandelettes de carton ondulé présentes dans les boîtes de plexiglas (Figure 10).



a.



b.



c.



d.



e.



f.

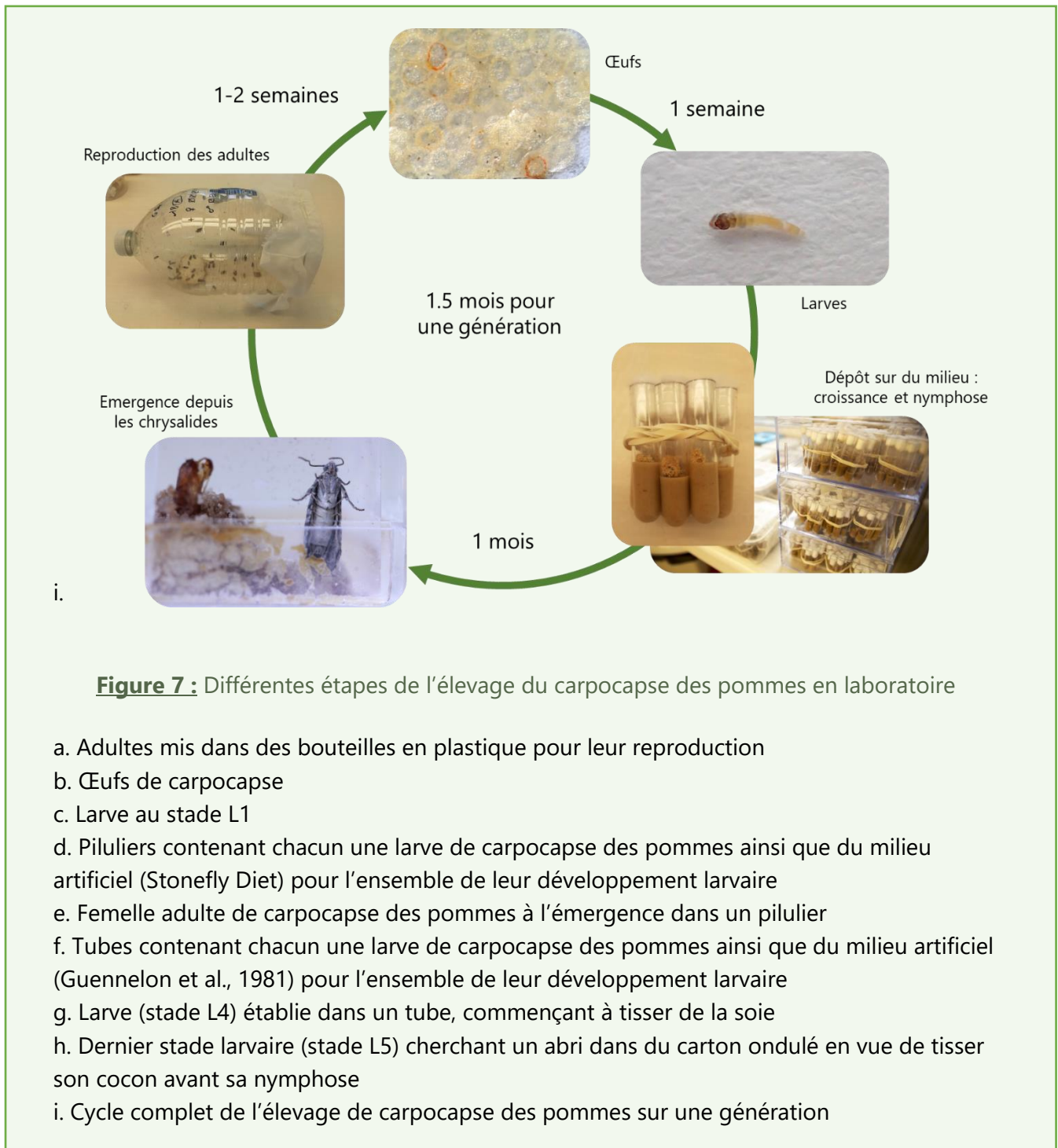


g.



h.





### iii. Pression insecticide

Pour sélectionner les individus les moins sensibles, une pression de sélection est appliquée sur les insectes au stade cible des substances actives étudiées : la larve de stade L1. Ainsi, 15  $\mu\text{l}$  (volume nécessaire à couvrir toute la surface du milieu artificiel) de solution insecticide formulées sont déposés à la surface du milieu. Les tubes sont mis à sécher sous sorbonne pendant 3 heures avant d'y déposer individuellement des larves. Comme pour le maintien d'élevage d'une population, après 3 semaines, dans les conditions d'élevage, les tubes sont débouchés. A ce stade du cycle, un premier décompte du nombre de larves vivantes au stade L5, vivantes à un stade L3-L4 ou mortes est réalisé. Ces données sont utilisées pour estimer le phénotype de résistance des lignées au cours de l'expérimentation. La mortalité est également mesurée lors de l'émergence des papillons, nous donnant une estimation de la sélection réellement appliquée sur les individus.

Les insecticides suivants ont été utilisés (formulations commerciales) : chlorantraniliprole (Coragen®, Coragen Cheminova Agro France SAS [200  $\text{g.L}^{-1}$ ]), deltaméthrine (Decis®, Decis Protech Bayer Sas [15  $\text{g.L}^{-1}$ ]) et spinosad (Success 4®, Success 4 Corteva Agriscience France S.A.S. [480  $\text{g.L}^{-1}$ ]). Ces insecticides ont été choisis selon différents critères : la sensibilité de notre population initiale, leur utilisation et la fréquence d'individus résistants en France. Le chlorantraniliprole est actuellement l'un des principaux insecticides utilisés en agriculture conventionnelle et l'émergence de résistances, associées à une activité accrue des P450, a été observée sur le terrain (Bosch et al. 2018). La deltaméthrine a été utilisée pendant des décennies en plein champ et est toujours utilisée, malgré des résistances rapportées à plusieurs reprises depuis plus de 25 ans, dues à des RLC et à une activité accrue des enzymes de détoxification (Reyes et al. 2009). Le spinosad est l'une des principales substances de contrôle utilisées dans en agriculture biologique. Il n'a pas été identifié de variation d'expression génique ou de polymorphismes associés à la résistance à cette substance active et cette résistance se retrouve peu fréquemment sur le terrain (Siegwart, comm. pers.).

### iv. Design expérimental

Le design expérimental conduit a été le suivant, adapté de (Cattel et al., 2020) (Figure 11 et table 3). Après acclimatation et multiplication au laboratoire de notre population initiale pour atteindre un taux de croissance nous permettant d'appliquer une pression de sélection, 3 lignées ont été créées à la génération 6 (F6) en appliquant des pressions de sélection avec 3

substances actives différentes : chlorantraniliprole (CHL), deltaméthrine (DEL) et spinosad (SPI). À partir de la génération 7 (F7) et pour chaque lignée, 3 réplicas ont été créés, portant le total de lignées sous sélection à 9. Il a également été maintenu une lignée témoin, correspondant à la population sauvage élevée sans pression insecticide et une lignée hybride provenant du croisement entre la lignée témoin et la souche sensible de référence.

La première pression de sélection se voulait faible (inférieure à 40% de mortalité), pour ne pas sélectionner que les allèles de résistance à effet fort potentiellement déjà présents dans la population et ne pas tuer trop d'individus. La deuxième pression de sélection appliquée l'a été à une dose forte (supérieure à 60% de mortalité), pour que la fréquence des allèles de résistance augmente dans les différentes lignées avant de réaliser un croisement avec une souche sensible de référence. Ce croisement a pour but de ségréger les différents allèles conférant la résistance pour que les lignées puissent se différencier entre elles en cas de résistance multiple. La génération suivant ce croisement n'a pas été exposée à une pression de sélection insecticide, pour ne pas éliminer les allèles de résistance récessifs car cette génération est constituée entièrement d'hétérozygotes.

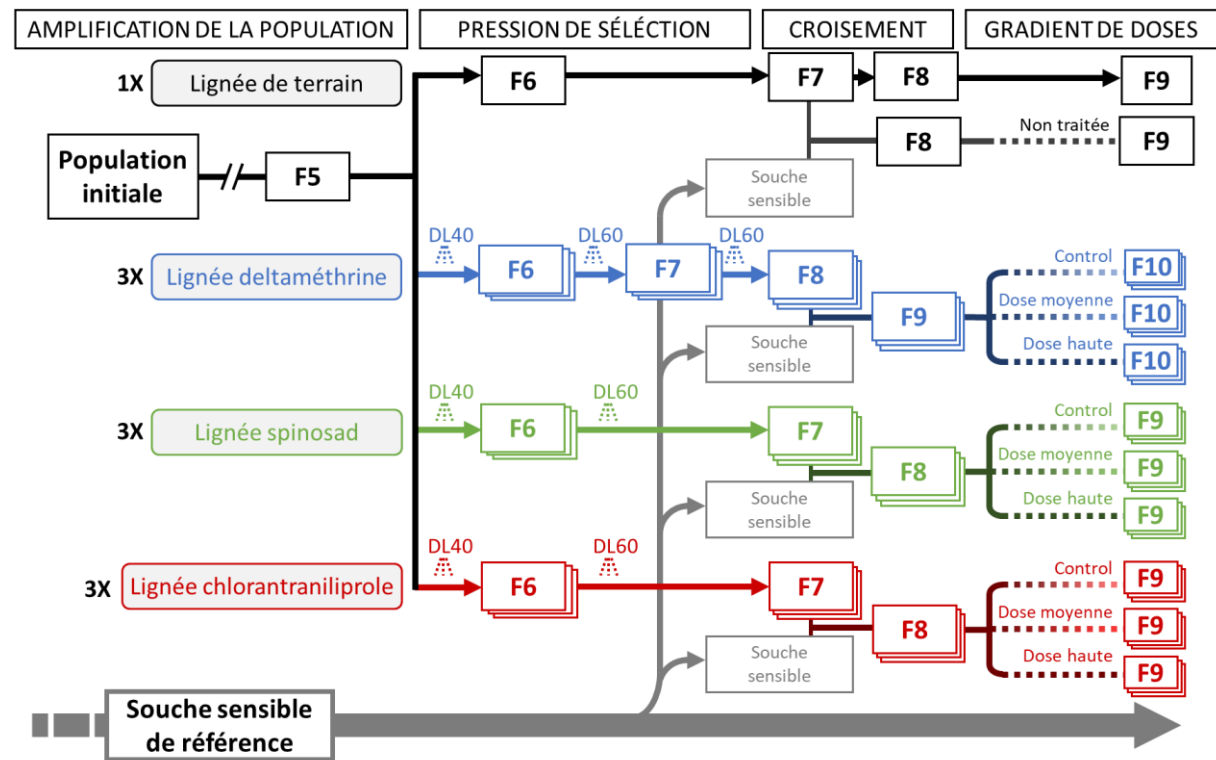
Enfin, un gradient de 3 doses a été appliqué à la dernière génération (F9-F10) afin de créer des sous-lignées ayant des pressions de sélection différentes et ayant des fréquences croissantes d'allèles associés à la résistance :

- Sans pression de sélection : sous-lignée Control
- Pression de sélection moyenne (comprise entre 50 et 60% de mortalité) : sous-lignée Dose Moyenne (DM)
- Pression de sélection forte (supérieure à 60% de mortalité) : sous-lignée Dose Haute (DH)

Ce gradient a été effectué afin de pouvoir comparer les fréquences alléliques et le nombre de copie des allèles de résistances entre sous-lignées afin d'identifier les variants génétiques responsables des résistances.

Substance active insecticide	Evolution expérimentale				Bioessais de phénotypage en F9 ou10					
	DL40	DL60	Dose moyenne	Dose haute						
Chlorantraniliprole	0,3	0,83	0,37	0,9	0,3	0,53	0,95	1,69	3	
Deltaméthrine	0,003	0,0045 puis 0,036	0,049	0,152	0,003	0,009	0,03	0,095	0,3	0,95
Spinosad	3,2	11,8	7,8	12	0,45	1,34	4,01	12	35,9	

**Tableau 3 :** Concentration (ppm) en substances actives utilisées lors de l'évolution expérimentale et lors des bioessais effectués lors de la dernière génération de chaque sous-lignée



**Figure 8 :** Schéma du design expérimental

## b. Phénotypage de la résistance

### i. Bioessais par ingestion

#### 1. Méthode standard (en plaques de microtitration)

La méthode de phénotypage usuelle a été décrite par Reyes et al., 2007.

Il s'agit de bioessais par ingestion sur larves de stade L1. Ils se conduisent dans des plaques de microtitration 96 puits, remplis de milieu artificiel ('StoneFly Diet') à base de farine de soja.

À l'aide d'une seringue sans aiguille, environ 150 µl de milieu sont injectés dans les puits de la plaque. Le milieu est ensuite lissé pour présenter une surface plane. Les traitements sont réalisés en appliquant à l'aide d'une micropipette, 6 µL de solution insecticide à la surface du milieu nutritif. La mortalité, pour chaque dose insecticide testée, est réalisée sur 24 individus (une larve par puits). Dès que tous les puits d'une colonne sont infestés, ils sont fermés hermétiquement par une bande de Parafilm. La microplaque est ensuite placée pendant 7 jours en salle d'élevage (23 ± 2°C, RH 65 ± 5% et 16:8 L:D h). La lecture du test se fait à l'issue des 7 jours et sont distingués 3 types de larves :

- les larves vivantes, qui présentent une mobilité normale.
- les larves moribondes, qui répondent à une stimulation avec une pince mais sont incapables de se déplacer et sont comptées comme mortes.
- les larves mortes, qui sont immobiles et ne répondent pas aux stimulations avec une pince.

Ces bioessais ont été effectués aux générations suivantes : F0, F6, F9-F10.

#### 2. Méthode adaptée à l'expérimentation d'évolution expérimentale (en tubes)

Afin de déterminer les doses à appliquer pour chaque pression de sélection voulue en « temps réel », des bioessais spécifiques à notre expérimentation et à notre méthode d'élevage ont également été nécessaires.

Ces bioessais suivent la même méthode que l'application de pression insecticide lors de l'expérimentation (cf. paragraphe III. a. iii.), à la différence qu'ils ont été conduits sur un plus petit nombre d'individus et avec des gammes de concentrations d'insecticides. Pour chaque bioessai, 6 à 8 concentrations ont été testées, avec 12 à 35 individus pour chaque

concentration. L'estimation de la mortalité est réalisée 3 semaines après installation des larves en tubes. Comme pour les bioessais en plaques de microtitration, un comptage des 3 types de larves (vivantes, moribondes et mortes) est effectué. Ces bioessais ont été effectués sur chaque génération.

Ces bioessais ont été utilisés de deux façons : en bioessais de calibration et de vérification. En effet, l'évolution expérimentale est une expérimentation dynamique qui nécessite d'avoir des données de phénotypage sur toute la période de sa réalisation. Dans un souci de temps et de faisabilité, nous nous sommes appuyés sur des données de mortalité à 21 jours. En effet, le temps de développement du carpocapse, de l'éclosion de l'œuf à l'émergence du papillon, dure entre 35 et 45 jours (Figure 10), il n'était donc pas possible de mener de front les bioessais visant à calibrer la pression de sélection et la sélection elle-même. Cela nous a également amené à utiliser la génération n-1 pour estimer la pression de sélection à appliquer à la génération n (bioessais de calibration). Pour savoir quelle a été la pression de sélection réellement appliquée, nous avons également fait des bioessais sur les générations n (bioessais de vérification). Les concentrations correspondant aux DL visées sont récapitulées dans la Table 2.

## ii. Analyses biochimiques

Un autre type d'analyse a été effectué pour phénotyper la résistance des individus. Il s'agit d'analyses biochimiques qui consistent à quantifier l'activité de 3 familles d'enzymes connues pour être impliquées dans la détoxification : les Mono-Oxygénases à Fonction multiple à cytochromes p450 (MFO), les CarboxylEstérases (CbE) et les Glutathion-S-Transférases (GST).

### 1. Quantification de l'activité MFO

L'activité des MFO est déterminée en se basant sur l'O-dééthylation du 7-éthoxycoumarin (ECOD) (Ulrich et Weber 1972) adapté pour l'analyse des tissus organiques en microplaques. Un échantillon correspond à la moitié d'un abdomen de carpocapse, prélevée sur un individu récolté à l'émergence et immédiatement utilisée pour le dosage enzymatique. Chaque échantillon a été broyé et homogénéisé avec un mini homogénéisateur manuel dans un tampon d'incubation contenant 100 µl de tampon Hepes (50 mM pH 7,0) auquel est ajouté de la 7-éthoxycoumarine (0,4 mM) sur glace. Après une incubation de 4h à 30 °C, la réaction est arrêtée en ajoutant 100 µl de tampon glycine 1.5M (pH 10,3) et la solution est centrifugée à 15 000 g pendant 2 min à 2 °C. Le surnageant est placé dans un puit de microplaques noires 96

puits. La fluorescence de la 7-hydroxycoumarine (HC) a été quantifiée par lecture de la fluorescence émise à 465 nm après une excitation à 380 nm. Trois puits par microplaques contiennent les réactifs seuls (sans tissus d'insectes) pour avoir des blancs (avec tampon glycine).

L'activité enzymatique se calculant en quantité de produit formé par minute et par quantité de protéines totales présent lors de la réaction, pour normaliser les résultats, la quantité totale de protéine est estimée selon la méthode de Bradford (Bradford 1976).

L'activité MFO est exprimée en pg de 7-Hydroxycoumarine (7-HC).min<sup>-1</sup>.mg de protéine totale<sup>-1</sup> en utilisant une courbe standard de 7-HC (0,5-4,5 nmoles.puits<sup>-1</sup>) pour convertir la fluorescence en quantité de 7-HC.

## 2. Quantification de l'activité CbE

L'activité totale non spécifique des CbE a été mesurée avec de l' $\alpha$ -naphtyl acétate ( $\alpha$ -NA) comme substrat (Reyes 2007). Le mélange réactionnel était composé de 1  $\mu$ l d'extrait protéique d'insecte (extrait protéique correspondant au broyat d'un demi abdomen de carpopapse prélevé sur un individu émergent et 100  $\mu$ l de tampon Hepes (50 mM pH 7,0)) et de 194  $\mu$ l d' $\alpha$ -NA à 30  $\mu$ M dans un tampon Hepes (50 mM, pH 7,0) dans chaque puits de microplaque. Trois puits par microplaque ont été remplis avec 1  $\mu$ l de tampon Hepes (50 mM, pH 7,0) à la place des extraits protéiques afin d'avoir des blancs. Après 20 min d'incubation à 22 °C à l'obscurité, la réaction a été arrêtée et colorée par l'ajout de 55  $\mu$ l de GBC Fast Garnet à 0,2% dilué dans une solution de dodécylsulfate de sodium à 2,5 %. L'absorbance a été lue à 590 nm, après incubation pendant 20 min dans l'obscurité à température ambiante. Le dosage de la quantité totale de protéines présentent dans l'extrait est estimée selon la méthode de Bradford (Bradford 1976). La courbe standard avec  $\alpha$ -Naphthol ( $\alpha$ -Nol) (0-18 nmoles.puits<sup>-1</sup>) est élaborée pour exprimer l'activité CbE en nmoles de produit.min<sup>-1</sup>.mg de protéine totale<sup>-1</sup>.

## 3. Quantification de l'activité GST

L'activité GST a été déterminée dans des microplaques transparentes (96 puits, Sterilin®, Newport, UK) en utilisant du 2,4-dinitro-chlorobenzène (CDNB) comme substrat (Nauen et Stumpf 2002). Le mélange réactionnel était composé de 2  $\mu$ l du même extrait d'insecte utilisé pour le dosage de l'activité enzymatique des CbE, 198  $\mu$ l d'une solution contenant : 10  $\mu$ l de glutathion (GSH) 50 mM, 185  $\mu$ l de tampon Hepes (50 mM, pH 7,0) et 3  $\mu$ l de CDBN 50 mM.

Trois puits par microplaque ont été remplis avec 2  $\mu$ l de tampon Hepes (50 mM, pH 7.0) à la place des extraits protéiques, afin d'avoir des blancs. La cinétique d'absorbance a été mesurée après 2 min d'incubation à 25 °C toutes les 30 secondes à 340nm. Le coefficient d'extinction molaire (9,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) du CDNB-glutathion a été utilisé pour convertir l'absorbance en  $\mu$ mol de CDNB-glutathion. L'activité spécifique finale a été exprimée en  $\mu$ mol de CDNB-glutathion.min<sup>-1</sup>.mg de protéine totale<sup>-1</sup>.

### c. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été conduites sur le logiciel R version 4.2.2 (R Core Team (2022)).

#### i. Bioessais par ingestion

Pour chaque lignée et génération, les effectifs des bioessais effectués sur les trois réplicas ont été analysés conjointement et des courbes dose-réponse ont été ajustées à l'aide d'un modèle log-probit à 3 paramètres issu du package 'drc' (Ritz, 2020). Les ajustements des modèles ont été vérifiés en utilisant la fonction modelFit du même package. Pour vérifier si les lignées sélectionnées étaient moins sensibles que la lignée sensible de référence, des tests-t ont été faits pour comparer les doses permettant de tuer 50% de la population choisie (DL50, paramètre standard utilisé en écotoxicologie) en utilisant la fonction compParm de 'drc'. Les mortalités aux doses discriminantes (doses permettant d'éliminer 95% de la population) ont été comparées selon un modèle linéaire généralisé suivant une distribution binomiale. Des tests de comparaisons multiples ont été effectués avec le package 'multcomp' avec un ajustement Tukey si nécessaire.

#### ii. Analyses biochimiques

Pour l'analyse des données d'activités enzymatiques, les différences entre les lignées et sous-lignées ont été faites à l'aide du test non-paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney (fonction pairwise.wilcox.test issue du package 'stats')

#### iii. Effets sub-létaux de l'exposition aux insecticides : analyse de la cinétique de développement de nos différentes lignées

Le suivi des individus tout au long de notre expérimentation nous a permis d'estimer le temps de développement des papillons pour chaque lignée et génération, et ainsi d'explorer les contrastes présents au sein des lignées et entre générations en fonction des traitements ou



encore du fond génétique des individus. Pour chaque individu, nous avons calculé le nombre de jours écoulés entre l'éclosion de la larve néonate et l'émergence du papillon. Cela nous a permis de construire la cinétique cumulée des émergences au cours du temps pour chaque lignée et génération. Afin de comparer ces cinétiques entre générations et entre lignées composées d'un nombre variable d'individus nous avons utilisé la cinétique de la proportion d'effectif cumulé pour chaque modalité. Cette comparaison a été effectuée par des tests de Kolmogorov-Smirnov (fonction `ks.test` issue du package 'stats').

## IV. Résultats

### a. Mise en œuvre d'une évolution expérimentale sur lépidoptère

#### i. Optimisation des méthodes d'élevage pour acclimater et augmenter le nombre d'individus

Après sortie de diapause des individus prélevés sur le terrain, il a fallu acclimater la population aux conditions de laboratoire puis passer à une phase de multiplication afin d'avoir un nombre d'individus suffisants pour pouvoir exercer une pression de sélection. Pour cela nous avons dû améliorer la méthode d'élevage des populations sauvages en insectarium. Dans un premier temps nous avons utilisé la méthode, déjà en place dans notre laboratoire, utilisant du milieu artificiel à base de farine de soja ('Stonefly diet') placé dans des piluliers cubiques (Figure 10.d).

Au total, 1500 papillons de la population sauvage ont été sortis de diapause et ont été accouplés entre eux (le détail des effectifs de chaque génération est dans le tableau 4). Leurs descendants ont été placés dans des piluliers individuels contenant du milieu artificiel nécessaire à leur développement larvaire. Nous avons ainsi obtenu un taux de croissance de 0,972 pour la F1 et 1,055 pour la F2, ainsi qu'une proportion d'émergence de papillons passant de 14,5 à 18,7% (Figure 12). Ces données n'indiquant pas de chute dans la taille de la population, nous avons pu passer à la phase de multiplication.

Cependant, nous nous sommes heurtés à plusieurs défis techniques et méthodologiques : nous avons dû utiliser un nouveau lot de milieu artificiel qui s'est avéré défaillant et qui a engendré une très forte mortalité larvaire. En effet, le taux de croissance a diminué de moitié, provoquant une chute du nombre d'adultes émergés. De plus, de la condensation est apparue sur une grande partie des piluliers (en fonction de leur lieu de stockage), ce qui a également eu un impact négatif sur le succès d'émergence des papillons. Pour pallier à cela, nous avons d'abord changé de lot de milieu pour l'installation de larves dès la constatation de la chute du nombre de papillons adultes émergents lors de la génération précédente, puis nous avons changé notre méthode d'élevage en passant progressivement à un élevage dans des tubes individuels avec un nouveau type de milieu artificiel de type gélosé à base de maïs (en F5) (Guennelon et al., 1981).

Insecticide	Génération	LD	Réplica	Nombre d'individus
CHL	G0			1700
	G1			972
	G2			1025
	G3			547
	G4			596
	G5			2590
	G6	40		1129
	G7	60	R1	118
			R2	76
			R3	65
	G8	0	R1	776
			R2	585
			R3	634
	G9	0	R1	178
			R2	183
R3			184	
G9	25	R1	273	
		R2	255	
		R3	269	
G9	75	R1	312	
		R2	239	
		R3	261	
G6	40	NA	1745	
G7	60	R1	307	
		R2	340	
		R3	265	
G8	0	R1	121	
		R2	88	
		R3	78	
G9	0	R1	744	
		R2	567	
		R3	445	
G9	0	R1	187	
		R2	196	
		R3	149	
G10	25	R1	318	
		R2	285	
		R3	250	
G9	75	R1	59	
		R2	61	
		R3	65	
G6	40	NA	1498	
G7	60	R1	121	
		R2	88	
		R3	78	
G8	0	R1	744	
		R2	567	
		R3	445	
G9	0	R1	272	
		R2	231	
		R3	120	
G9	25	R1	181	
		R2	147	
		R3	173	
G9	75	R1	314	
		R2	179	
		R3	186	

**Tableau 4 :** Nombre d'individus adultes de chaque génération qui ont été utilisés pour former la génération suivante de l'évolution expérimentale.

Différentes modalités d'élevage ont également été testées à la 5<sup>e</sup> génération, afin d'avoir une méthode d'élevage ayant le plus haut rendement (Figure 13) : percer le milieu avant d'installer les larves (Figure 13 A), ajouter de la levure nutritive à la surface des tubes de milieu juste avant d'installer les larves (Figure 13 B), mettre à l'envers les tubes après installation des larves pendant différents laps de temps (Figure 13 C). De plus, nous avons cherché à savoir si notre méthodologie avait également un impact sur le rendement de notre élevage, en identifiant s'il y avait un effet de l'emplacement des tubes dans la salle d'élevage (séparée en 2 paillasse principales : 18-G, avec une moyenne de 22.3°C et 46,75% d'humidité et 18-D, avec une moyenne de 22.8°C et de 42,65% d'humidité) (Figure 13 D), du stockage au froid (Figure 13 E), du moment dans la journée où les larves sont posées (Figure 13 F) et du nombre de poses de larves par jour (et donc l'âge des larves posées) (Figure 13 G).

Nous avons évalué l'impact des différentes modalités sur 3 paramètres : le taux d'installation des larves déposées (panneaux 'Installation'), le taux d'émergence des larves déposées (panneaux 'Emergence') et le taux d'émergence des larves qui se sont installées avec succès (panneaux 'Emergence\_installees').

Nous avons observé que le perçage du milieu, la présence de levure, la mise à l'envers, la sortie du froid et le moment de pose n'ont d'impact sur aucun des 3 paramètres considérés.

L'emplacement dans la salle d'élevage et le nombre de poses dans la journée ont eu un impact. On peut remarquer que les tubes placés sur la paillasse 18-G entraîne un taux d'émergence supérieur des larves déjà installées dans notre salle d'élevage ( $p$ -value =0,001), mais aucune différence significative n'existe entre nos paillasse pour les autres paramètres. Il a ainsi été décidé de privilégier cette paillasse pour y placer les tubes dont les larves étaient installées. Concernant le nombre de poses dans la journée, on peut voir que les taux d'émergence de toutes les larves (déposées ou installées) est significativement supérieur quand 2 poses sont effectuées dans la journée et que les larves sont les plus jeunes possibles ( $p$ -value<0,0001). Il a donc également été décidé de poser des larves 2 fois par jour.

Ces différentes expérimentations nous ont permis de déterminer la méthodologie la plus performante et atteindre un taux de croissance (arrivant à 4.35 en F5) et une proportion d'adultes émergés qui a été multipliée par plus de 3 pour un nombre de larves posées

équivalent à ceux des autres générations. Cela nous a donc permis de commencer la phase de sélection et pouvoir appliquer différentes pressions insecticides.

ii. Détermination des pressions de sélection

À partir de la F6, une pression de sélection avec 3 substances actives (chlorantraniliprole, deltaméthrine et spinosad) a été mise en place, créant ainsi 3 lignées différentes.

La mortalité corrigée a été de 29,9% pour avec 0,3 ppm de chlorantraniliprole et de 16,1% avec 3,2 ppm de spinosad et de 7,8% avec 0,003 ppm de deltaméthrine, cela correspondant bien à une pression de sélection faible comme celle visée (inférieure à 40% de mortalité brute) (Table 2, figure 5).

Trois répliques pour chaque lignée ont également été créés en divisant les adultes de nos lignées de la génération F6 en 3 sous-populations distinctes, amenant le total de lignées à 9. Nous avons créé les répliques au moment des accouplements des adultes F6 afin de pouvoir exercer une pression de sélection sur leur descendance. Nous avons veillé à créer ces répliques de la façon la plus randomisée possible et en ayant le plus grand brassage génétique possible. Au moment de former les répliques, nous avons pris soin de prélever entre 20 et 25 mâles et 20 et 25 femelles provenant d'un maximum de bouteilles d'accouplement de la génération précédente. Les adultes formant les répliques ont été reproduits dans des bouteilles ayant entre 55 et 100 individus, pour avoir un effectif par réplique entre 184 et 276 individus.

Les larves de la génération F7 ont ensuite été soumises à une deuxième phase de sélection à pression de sélection plus forte.

Les mortalités corrigées ont été de 73,8% pour 0,83 ppm de chlorantraniliprole et 72,4% pour 11,8 ppm de spinosad ce qui correspondait à nos objectifs (mortalité supérieure à 60%).

Néanmoins pour la deltaméthrine la pression de sélection n'a pas été suffisante, 0,0045 ppm n'entraînant que 12,1% de mortalité corrigée, ce que nous avons estimé être trop faible par rapport à notre objectif de sélection. Nous avons donc effectué une génération supplémentaire pour cette lignée en appliquant une pression de sélection plus élevée (0,036 ppm), ce qui a entraîné une mortalité de 70%.

Les mortalités observées lors de la dernière génération de sélection (en F9 ou F10) ont toutes été proches de l'attendu. On peut noter que les sous-lignées Control (i.e non exposées à un

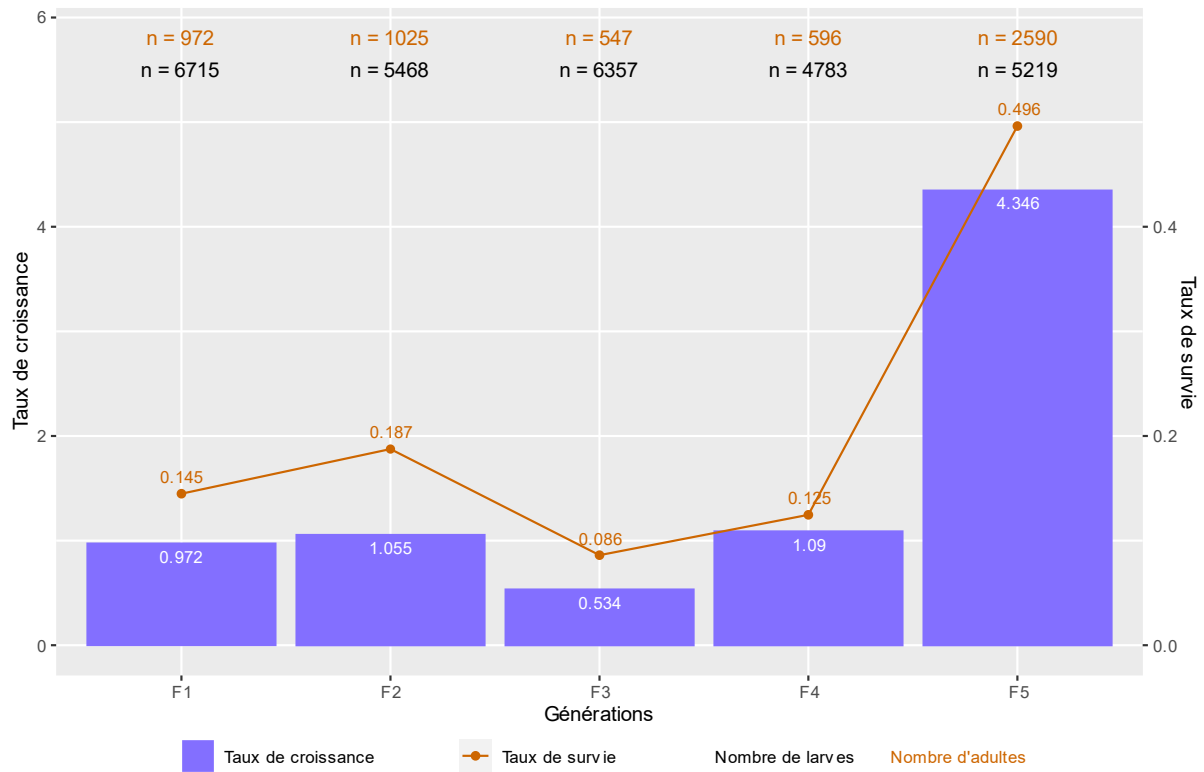
insecticide) se sont mieux développées que la souche Témoin de notre expérimentation (les mortalités corrigées étant négatives pour toutes les sous-lignées).

iii. Choisir le bon phénotypage

1. A quel stade mesurer la mortalité ?

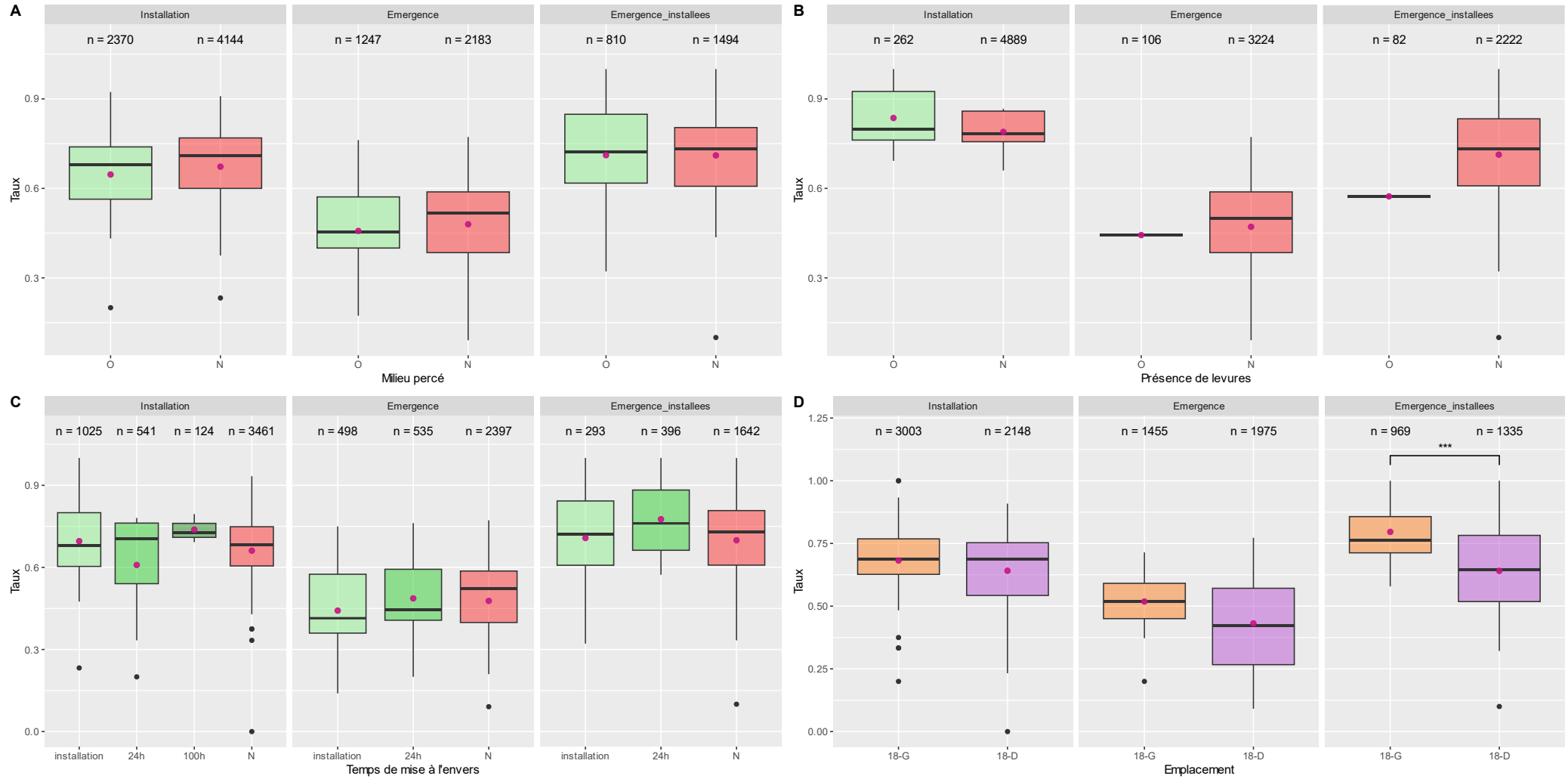
En comparant les données de mortalité corrigées pour chacune des lignées selon le stade auquel la mortalité a été observée : à 21 jours (Stade Installation) et à l'émergence (Stade Emergence) (Figure 5), on peut remarquer que les résultats diffèrent selon les substances actives. En effet, lorsqu'une pression de sélection est appliquée, pour la lignée Spinosad, il n'y a pas de différences entre la mortalité à 21 jours et la mortalité à l'émergence. Toutefois, on peut voir que pour la lignée Deltaméthrine, il y a toujours une différence entre les mortalités à 21j et la mortalité à l'émergence. Pour le Chlorantraniliprole, aucune tendance ne ressort, où une seule génération a une différence entre la mortalité à 21 jours et la mortalité à l'émergence.

Cependant, on peut voir que les concentrations appliquées, calculées selon les DL voulues aux générations n-1, lors de bioessais de calibration (Concentration et DL visée, Table 2) ont permis d'atteindre des DL relativement en accord (DL réalisée, Table 2) avec les DL visées (DL réalisées calculées lors des bioessais de vérification). Néanmoins, en ce qui concerne les pourcentages de mortalité observée (corrigée par rapport à la lignée Témoin pour prendre en compte la mortalité naturelle), ils ne correspondent pas toujours aux DL visées et/ou réalisées, sans qu'une tendance ne se dégage de nos données.



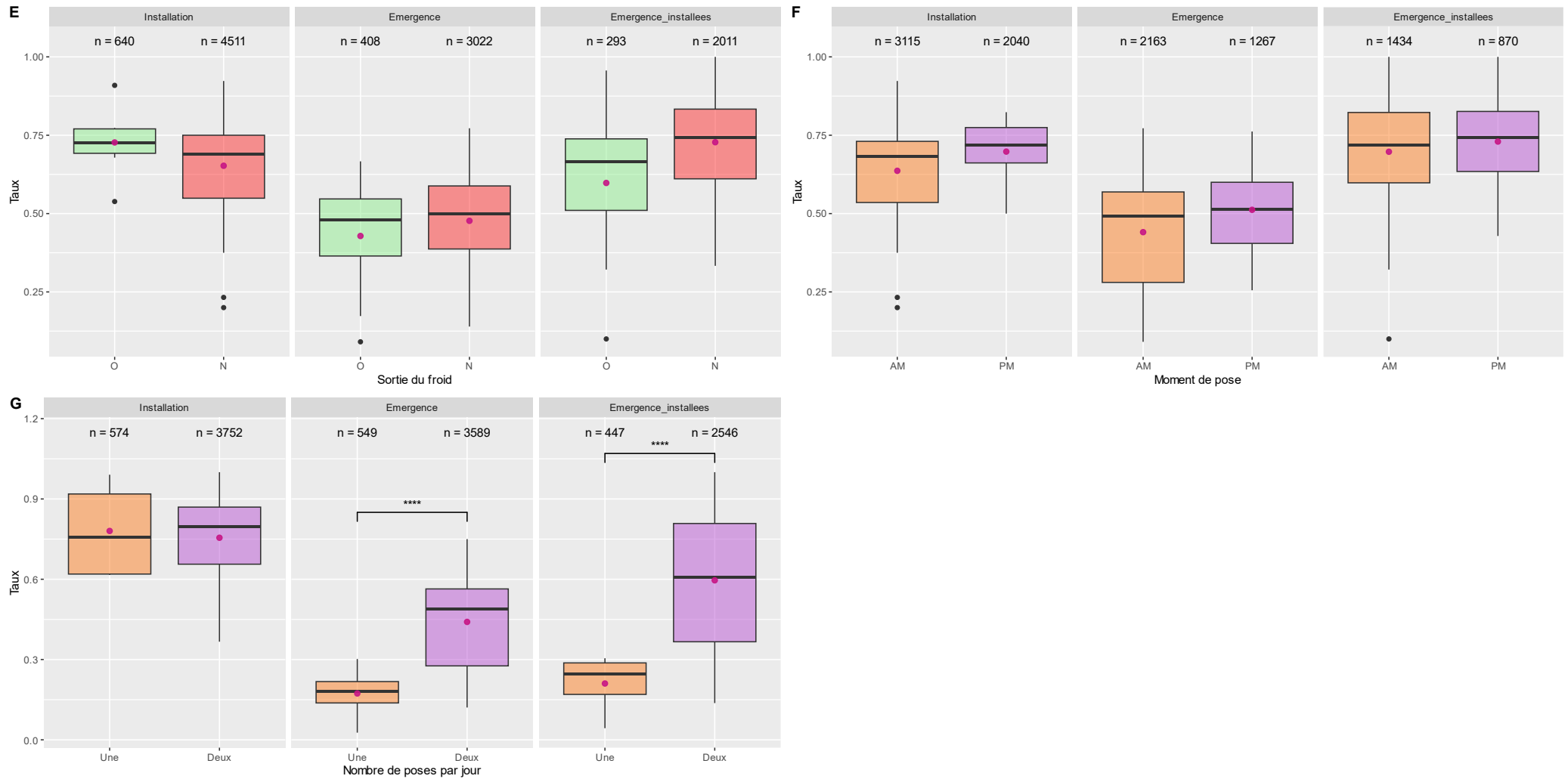
**Figure 9 :** Taux de croissance (nombre d'adultes à la génération  $n$  / nombre d'adultes à la génération  $n-1$ ) et taux de survie (nombre d'adultes émergés / nombre de larves installées sur milieu artificiel) pour les générations 1 à 5 de l'évolution expérimentale en absence de pression de sélection. Les encadrés au-dessus de chaque barre indiquent le nombre de larves déposées et le nombre de papillons émergés à chaque génération.

# Chapitre 1 : Mise en place de l'expérimentation d'évolution et réséquençage



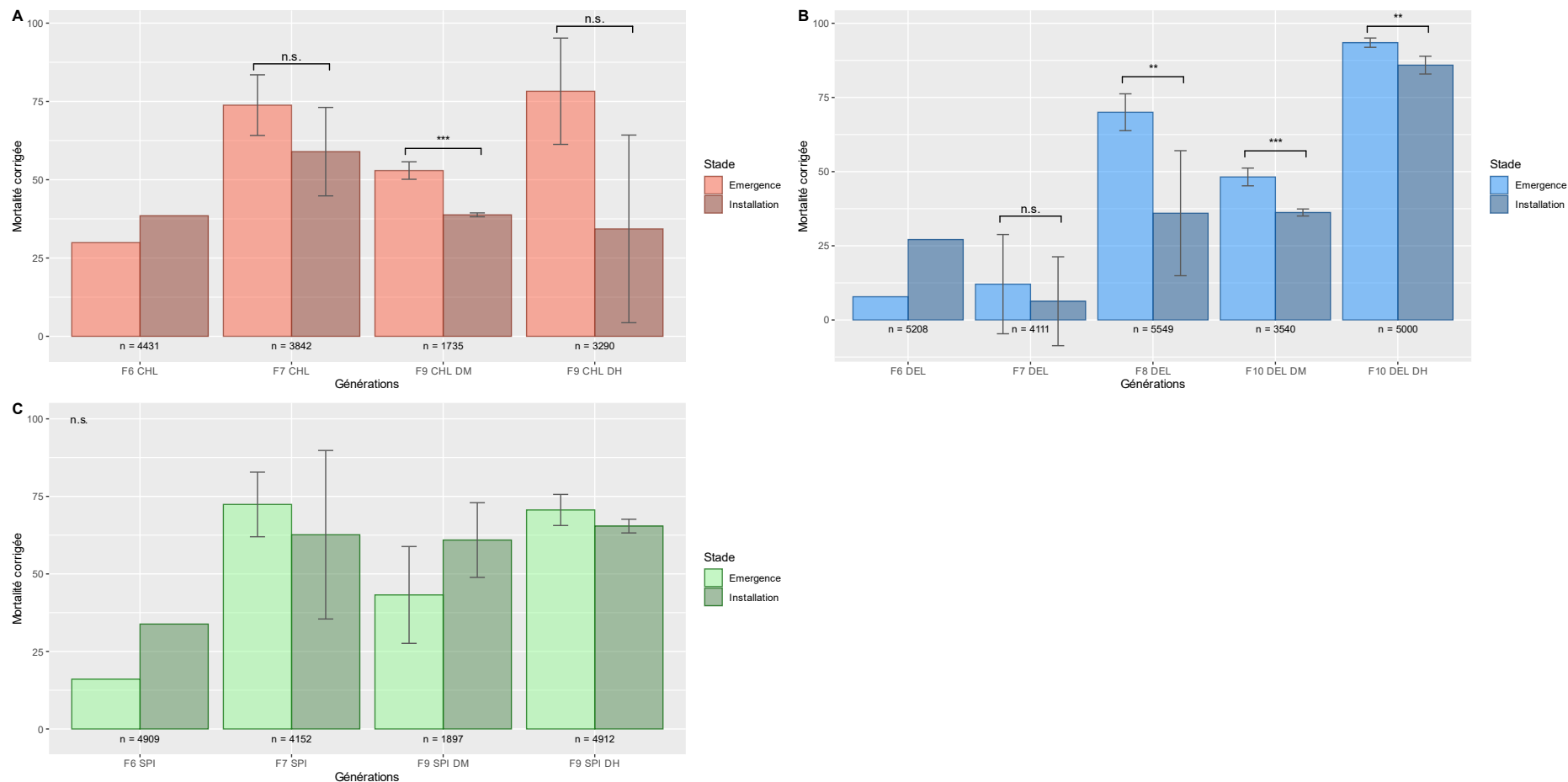


# Chapitre 1 : Mise en place de l'expérimentation d'évolution et réséquençage



**Figure 10 :** Taux d'installation (panneaux 'Installation'), d'émergence (panneaux 'Emergence') et d'émergence des larves s'étant installées avec succès (panneaux 'Emergence\_installees') selon différentes modalités testées au préalable du lancement des phases de sélection de notre évolution expérimentale. Pour chaque modalité, O et N correspondent à Oui ou Non, 18-G et 18-D correspondent aux paillasse de notre salle d'élevage, n correspond au nombre de larves considérées. Si des différences significatives sont présentes, elles ont été représentées par des étoiles (\*\*\*=  $P \leq 0,001$ ; \*\*\*\*=  $P \leq 0,0001$ ).

Modalités : A : Milieu percé / B : Présence de levure / C : Mise à l'envers / D : Emplacement / E : Sortie du froid / F : Moment de pose / G : Nombre de poses par jour



**Figure 11 :** Mortalités corrigées ( $\pm$ erreur standard) à 21 jours post-installation (Stade 'Installation') et à l'émergence (Stade 'Emergence') pour chaque génération et chaque lignée sous sélection de notre évolution expérimentale (A : Lignée Chlorantraniliprole, B : Lignée Deltaméthrine, C : Lignée Spinosad). La correction de mortalité s'est faite par rapport à notre lignée Témoin et les réplicas (à partir de la génération F7) ont été poolés.

Pour les F9 et F10, DM : Sous-lignée Dose Moyenne / DH : Sous-lignée Dose Haute.

Les différences significatives entre stades d'une même génération sont indiquées (n.s. : p-value >0,05 ; \* : p-value  $\leq$ 0,05 ; \*\* : p-value  $\leq$ 0,01 ; \*\*\* : p-value  $\leq$ 0,001).

Substance active	Génération	Concentration (ppm)	DL visée	Nombre d'individus utilisés pour les bioessais de vérification	DL réalisée	Mortalité corrigée observée (%)	
CHL	F6	0,3	40	260	41,1	29,9	
	F7	0,83	60	649	85,3	73,8	
	F9	Dose moyenne	0,37	< 50	1051	34,8	21,3
		Dose haute	0,9	> 50	1429	74	75,2
DEL	F6	0,003	40	384	53,5	7,8	
	F7	0,0045	60	596	26	12,1	
	F8	0,036	60	775	79,5	70,0	
	F10	Dose moyenne	0,049	< 50	826	56,2	58,5
		Dose haute	0,152	> 50	589	73,2	93,5
SPI	F6	3,2	40	261	46,7	16,1	
	F7	11,8	60	530	85	72,4	
	F9	Dose moyenne	7,8	< 50	983	68,8	54,5
		Dose haute	12	> 50	1004	79,7	76,7

**Tableau 5 :** Concentrations (en ppm), doses létales (DL) visées et réalisées et mortalité observée (corrigée par rapport à la lignée Témoin) pour chacune des générations sous sélection de l'expérimentation d'évolution expérimentale. Les bioessais de vérification ont permis de calculer les DL réalisées pour chaque génération

2. Comment phénotyper les individus en fin d'expérimentation ?

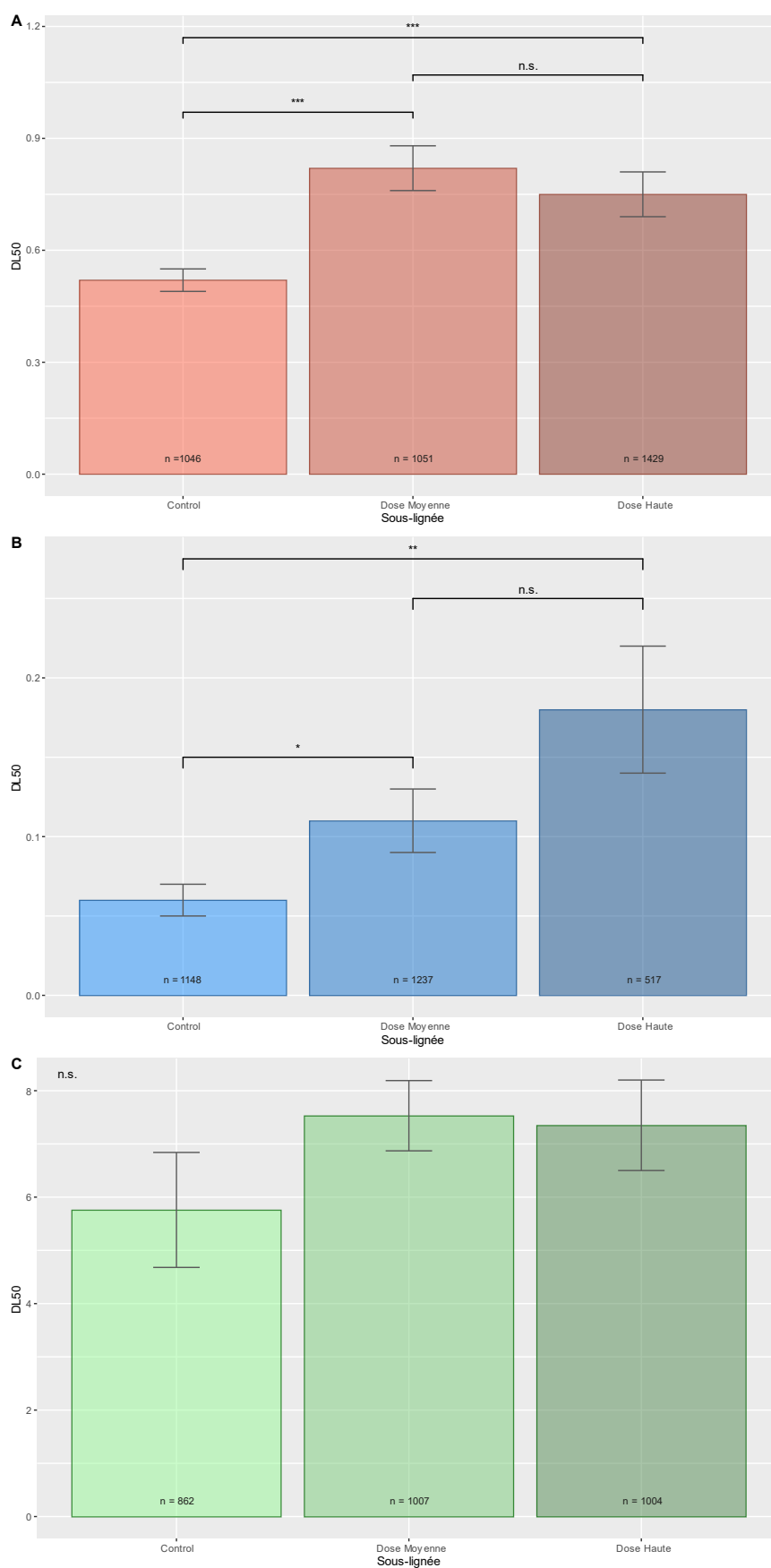
a. Bioessais par ingestion

Afin de caractériser le phénotype des différentes sous-lignées obtenues, nous avons effectué des bioessais avec la méthode standard (en microplaque) sur les descendants des survivants aux pressions de sélection appliquées en F9-10 pour passer un grand nombre d'individus. Les bioessais ont permis de calculer les DL50 (doses permettant de tuer 50% de la population). Cet indicateur nous permet de comparer les phénotypes des différentes sous-lignées (Figure 6).

Pour les sous-lignées Chlorantraniliprole, la DL50 est 1,6 fois plus grande entre la sous-lignée Control et la sous-lignée Dose Moyenne ( $p$ -value  $< 0,001$ ) et est 1.5 fois plus grande entre la lignée Control et la sous-lignée Dose Haute ( $p$ -value  $< 0,001$ ) (Figure 6A). Les valeurs de DL50 entre les sous-lignées sous sélection (Dose Moyenne et Dose Haute) ne sont pas significativement différentes.

Pour les sous-lignées Deltaméthrine, la DL50 est 2 fois plus grande entre la sous-lignée Control et la sous-lignée Dose Moyenne ( $p$ -value  $< 0,05$ ) et est 3 fois plus grande entre la lignée Control et la sous-lignée Dose Haute ( $p$ -value  $< 0,001$ ) (Figure 6B). Les valeurs de DL50 entre les sous-lignées sous sélection ne sont pas significativement différentes.

Pour les sous-lignées Spinosad, les DL50 ne sont pas significativement différentes, quelles que soient les sous-lignées comparées (Figure 4C).



**Figure 12 :** DL50 ( $\pm$  erreur standard) des différentes sous-lignées chlorantraniliprole (A), deltaméthrine (B) et spinosad (C) aux générations F9-10, calculées grâce aux bioessais en plaques de microtitration. Les différences significatives entre sous-lignées sont indiquées (n.s. : p-value  $>0,05$  ; \* : p-value  $\leq 0,05$  ; \*\* : p-value  $\leq 0,01$  ; \*\*\* : p-value  $\leq 0,001$ ).

*b. Bioessais biochimiques*

Nous avons également mesuré les activités enzymatiques des MFO, CbE et GST sur des individus issus des sous-lignées aux générations F9-F10, pour évaluer s'il y avait un impact de la pression de sélection et/ou de l'ingestion d'insecticide sur les activités de ces enzymes, identifiées comme impliquées dans les mécanismes de détoxification. Nous avons également mesuré les activités enzymatiques d'individus issus de la lignée témoin (TSV) ainsi que d'individus issus de la population sensible de référence du laboratoire (SV) (Figure 7).

*MFO*

On note un effet lié au sexe dans toutes les lignées, où les femelles ont une activité enzymatique significativement supérieure à celle des mâles ( $p$ -value = 0,006) (Figure 7).

Chez les mâles, aucune des sous-lignées n'est significativement différente de la lignée témoin ou de la population sensible de référence (Figure 7A). On peut cependant noter que les femelles de la sous-lignée Chlorantraniliprole Dose Haute (DH) ( $n = 33$ ) ont en moyenne une activité significativement supérieure à celle de la sous-lignée Dose Moyenne (DM) ( $n = 38$  ;  $p$ -value = 0,009) même s'il n'y a pas de différence significative avec la lignée témoin ou la population de référence sensible. Il n'y a aucune différence significative pour les sous-lignées Deltaméthrine, ni entre elles, ni avec la lignée Témoin ou la population sensible de référence. Les sous-lignées Spinosad ont toutes les trois une activité enzymatique plus faible que la lignée sensible (C :  $n = 34$ , DM :  $n = 36$ , DH :  $n = 38$  ;  $p$ -value < 0,05) mais elles ne présentent pas de différences significatives avec la lignée témoin (Figure 7B).

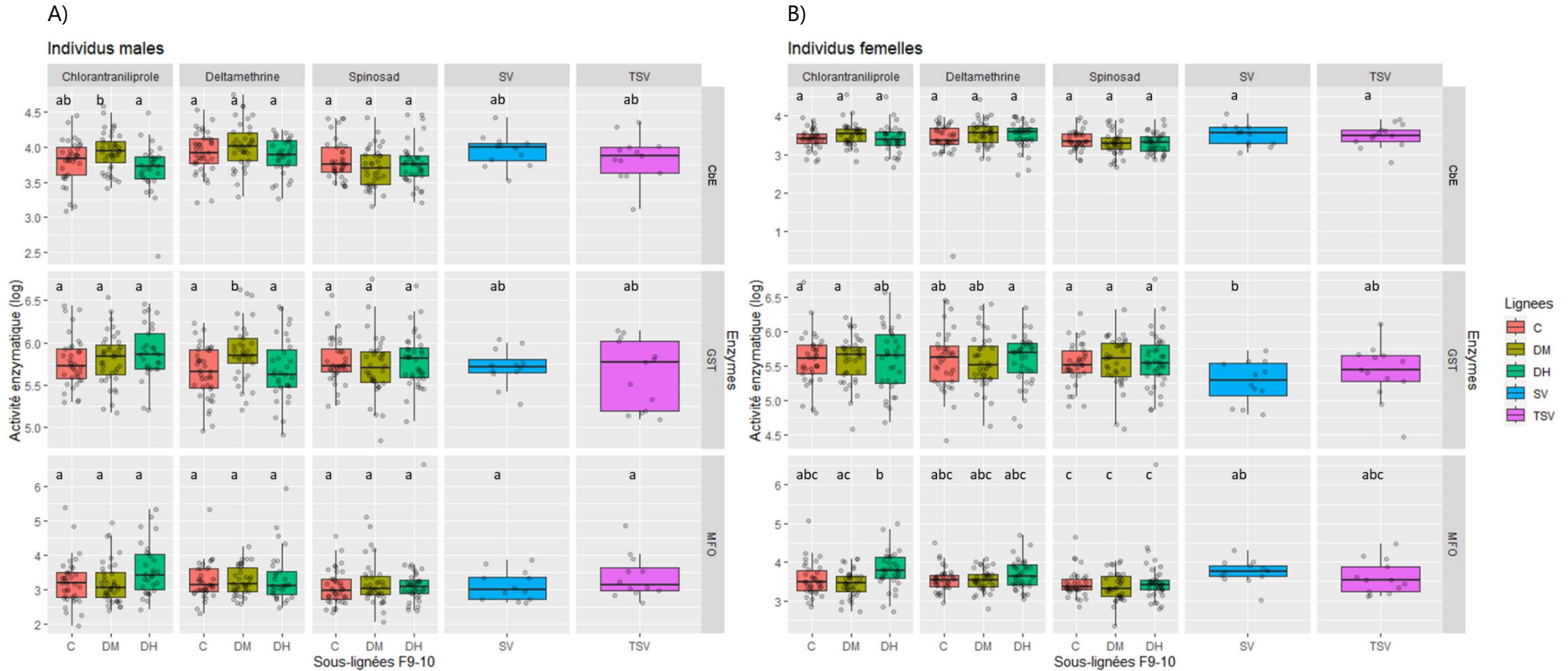
*CbE*

Pour cette famille d'enzyme, seul un effet lié sexe est visible. Les mâles ont une activité enzymatique supérieure aux femelles dans toutes les sous-lignées ( $p$ -value < 0,001) (Figure 7). Cependant, aucune différence significative n'est présente entre toutes les sous-lignées, chez les mâles comme chez les femelles.

*GST*

L'activité enzymatique des GST est significativement supérieure chez les femelles par rapport aux mâles ( $p$ -value < 0,001) (Figure 7).

Aucune des sous-lignées n'est significativement différente de la lignée témoin ou de la population de référence sensible. Cependant, pour la deltaméthrine, les mâles de la sous-lignée Dose Moyenne (n = 36) ont une activité enzymatique significativement supérieure à ceux des lignées Control et Dose Haute (C : n = 36, DH : n = 35 ; p-value < 0,05) mais ne présentent pas de différences significatives avec la lignée témoin ou la population sensible (Figure 7A). Chez les femelles, on peut noter que les sous-lignées spinosad ont une activité supérieure à celle de la population sensible (C : n = 34, DM : n = 36, DH : n = 39 ; SV : n = 13 ; p-value < 0,05), même si elles ne sont pas différentes de la lignée témoin (Figure 7B).



**Figure 13 :** Activité enzymatique des carboxylestérases (CbE) mesurée en nmol d' $\alpha$ -naphtol.min<sup>-1</sup>.mg de protéine<sup>-1</sup>, des glutathion-S-transférases (GST) mesurée en nmol de CDNB-GST.min<sup>-1</sup>.mg de protéine<sup>-1</sup> et mono-oxygénases à fonction multiple (MFO) mesurée en pg de 7EC.min<sup>-1</sup>.mg de protéine<sup>-1</sup>. Les mesures ont été effectuées sur des individus mâles (A) et femelles (B) dès leur émergence, issus des différentes sous-lignées des F9-10 (C : Control, DM : Dose Moyenne, DH : Dose Haute). Des lettres différentes indiquent une différence significative ( $\alpha = 0,05$ ).



b. Effets sub-létaux de l'exposition aux insecticides

- i. Variation du temps de développement de *C. pomonella*, indépendamment de son exposition à des insecticides

Dans un premier temps nous avons cherché à estimer la variation de temps de développement (de la larve néonatale à l'émergence de l'adulte) du carpocapse des pommes entre les générations de cette évolution expérimentale en absence de traitement insecticide. Pour cela nous avons comparé la lignée Témoin, qui n'a pas été traitée, aux générations 6, 7 et 8 sous pression de sélection. La génération 7 apparait légèrement plus rapide à émerger que la génération 6 (43 jours pour que la moitié des individus émergent à la génération 7 contre 46 jours pour la génération 6), mais cette différence n'est pas significative entre les 2 (Figure 8). La génération 8 a quant à elle été significativement plus lente à émerger que la génération 7 (K-S test, p-value = 0,036). Il lui a fallu environ 49 jours pour que la moitié des individus émergent. Nous observons donc des variations intergénérationnelles dans les temps de développement.

À la génération 7, une partie la lignée Témoin a été croisée avec la souche de population de référence sensible SV pour qu'elle subisse les mêmes évènements que les lignées sous sélection. On observe qu'il a fallu significativement plus de temps aux individus Témoin purs qu'aux individus issus du croisement avec la population de référence sensible SV pour émerger (K-S test, p-value = 0,010) (Figure 9). Il fallait en moyenne 44 jours pour les Témoins purs contre 42 jours pour les autres pour que la moitié des individus ait émergé. Ce résultat montre que des individus hybrides (hétérozygotes) sont plus rapides à se développer que ceux de la population sauvage utilisée pour l'expérimentation d'évolution expérimentale.

- ii. Influence de 3 insecticides sur la durée de développement de *C. pomonella*

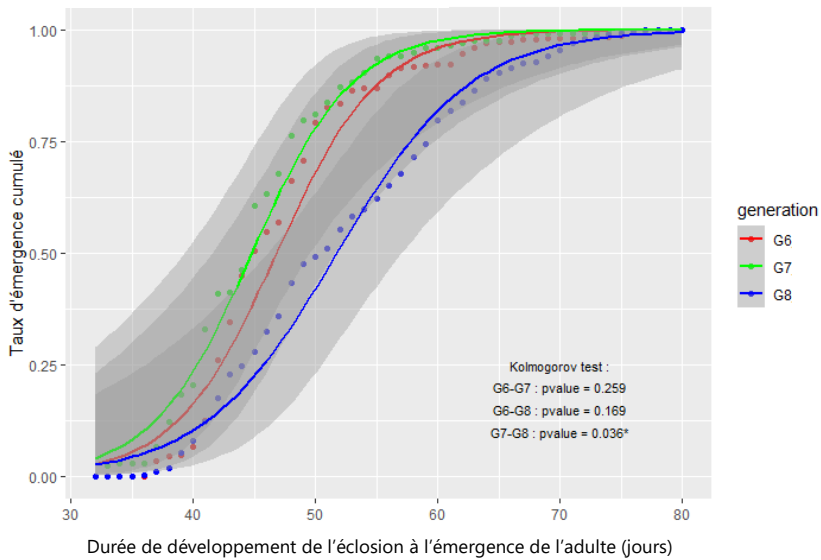
Nous observons, pour les trois substances actives étudiées, un phénomène comparable de ralentissement de la vitesse de développement en présence d'insecticide qui est dose dépendant. Ainsi dans la lignée DEL, nous observons un décalage de 11 jours de la cinétique d'émergence des papillons entre la génération 7 (faible dose) et la génération 8 (forte dose) (K-S test, p-value = 0,036). De même, nous constatons une différence importante de durée de développement qui atteint 18 jours entre les individus de la génération 8 (forte dose) et ceux de la génération 9 (sans insecticide) (K-S test, p-value < 0,01). Les individus de la génération 9

ont été croisés avec la population de référence sensible SV en plus de ne pas avoir été exposés à de la deltaméthrine (Figure 10A). Comme pour la lignée DEL, les individus de la lignée CHL sont plus lents à émerger quand ils sont soumis à une forte dose de chlorantraniliprole (génération 7) qu'à un faible dose (génération 6) (8 jours d'écart, K-S test, p-value = 0,031). Et, en absence de pression de sélection et après un croisement avec la population de référence sensible SV, les individus sont en moyenne 11 jours plus précoces que ceux soumis à une forte dose de chlorantraniliprole (génération 8) (K-S test, p-value = 0,005) (Figure 10B). Chez la lignée SPI, comme chez les précédentes, la vitesse d'émergence des individus ayant reçu une forte dose de spinosad (génération 7) apparaît ralentie par rapport à celle ayant reçu une faible dose (génération 6) (Figure 10C). Puis, les individus de la génération sans traitement et issus du croisement avec la population de référence sensible SV, sont de nouveau plus rapide à émerger. Cependant, ces différences, plus ténues, ne sont pas significatives.

Nous avons détecté ce phénomène d'allongement de la durée de développement des insectes à la dernière génération de notre expérience, lorsque les lignées sont divisées en trois, chacune étant soumise à une pression de sélection différente. Une tendance au ralentissement avec l'augmentation de la dose est observée pour les trois lignées. Bien que non significative, cette observation est intéressante car elle se répète 3 fois sur des manipulations indépendantes (Figure 11).

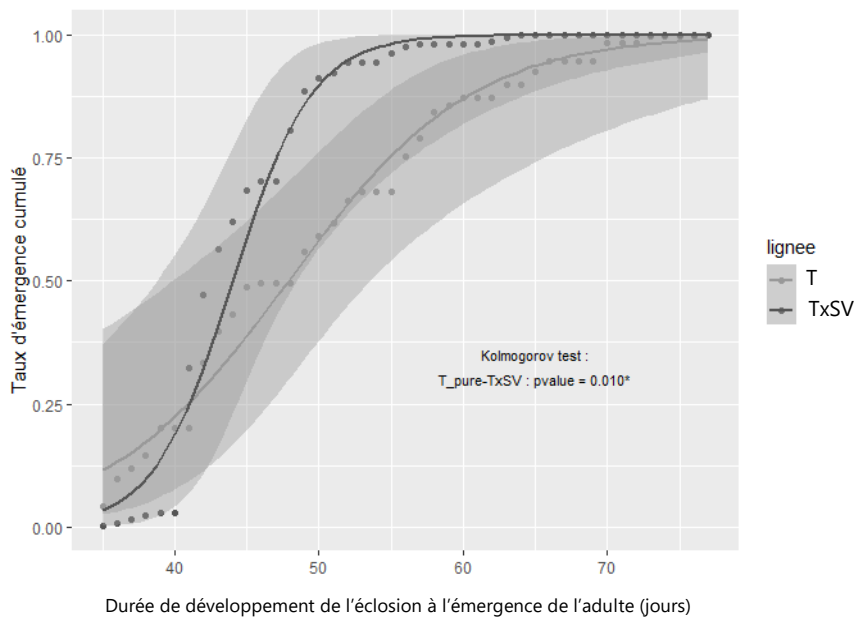
En ce qui concerne la comparaison des lignées entre elles, on peut remarquer qu'il n'y a pas de différences significatives entre les générations des lignées soumises à une forte pression de sélection (Figure 12). On peut cependant noter que l'exposition au spinosad a tendance à moins impacter la durée de développement que l'exposition au chlorantraniliprole et à la deltaméthrine.

### Lignée T



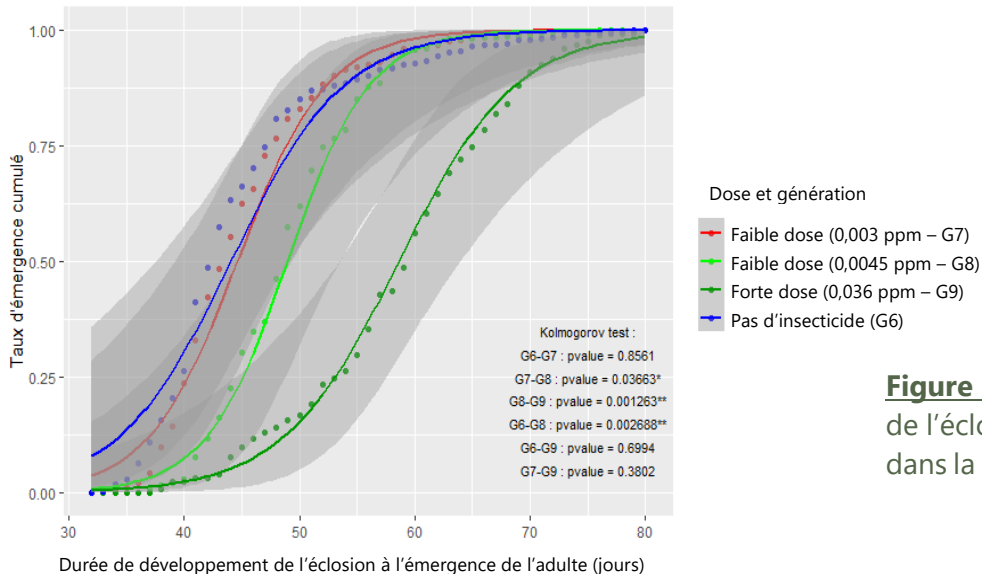
**Figure 14 :** Durée de développement (en jours) de l'éclosion à l'émergence des adultes dans la lignée T en fonction des générations (G6, G7 et G8).

### Lignées T et TxSV



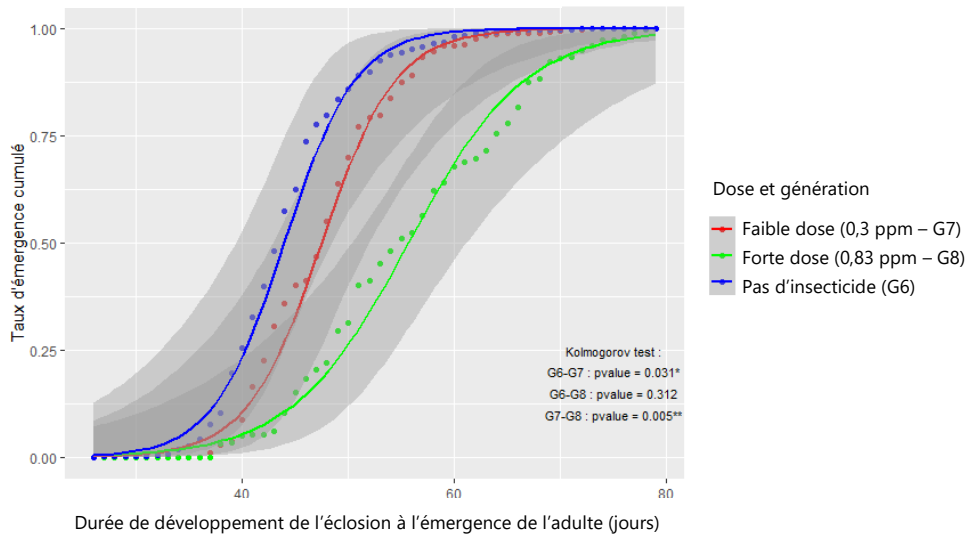
**Figure 15 :** Durée de développement (en jours) de l'éclosion à l'émergence des adultes dans la lignée T en fonction de son croisement avec la population de référence sensible de laboratoire (SV) ou non.

A Lignée DEL

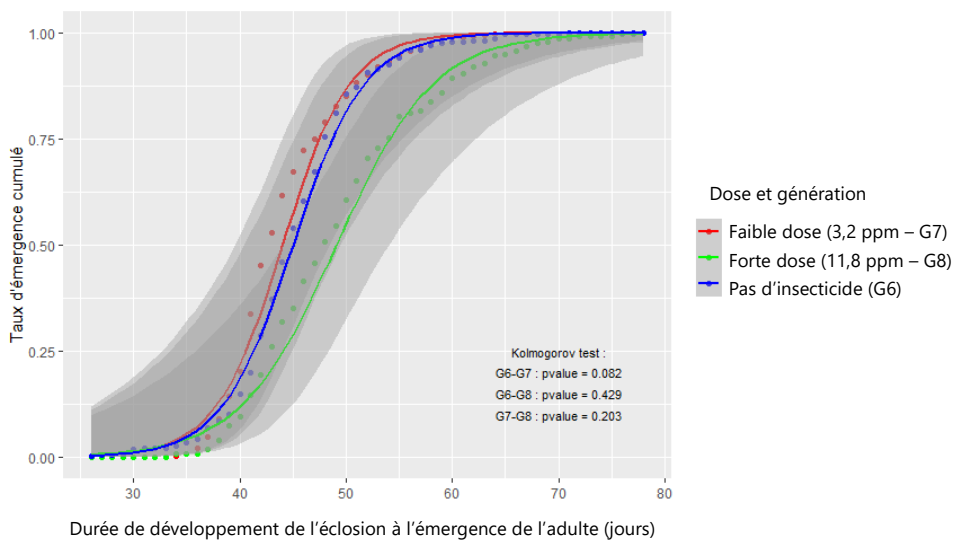


**Figure 16 :** Vitesse de développement de l'éclosion à l'émergence des adultes dans la lignée DEL (A), CHL (B) et SPI (C).

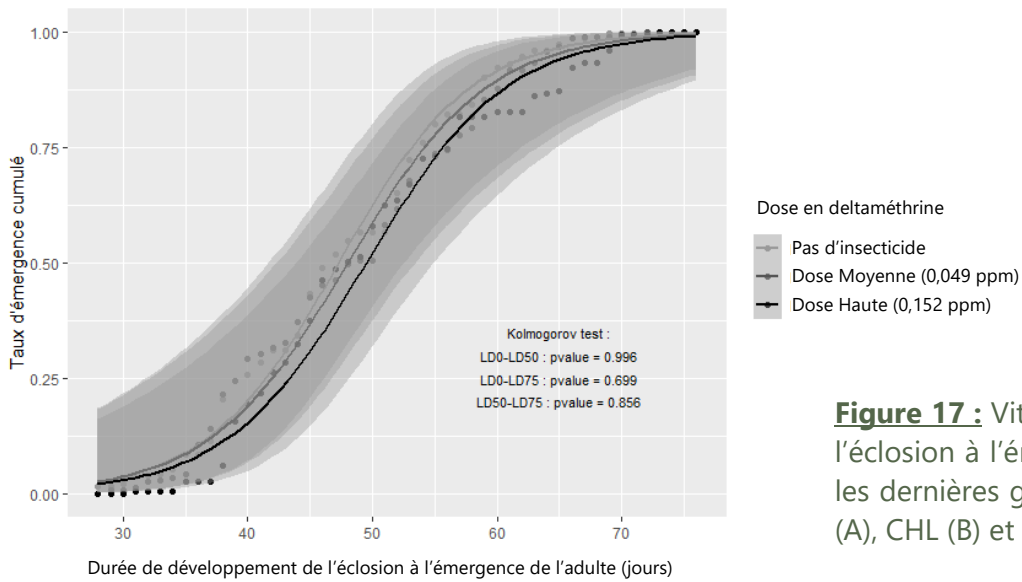
B Lignée CHL



C Lignée SPI

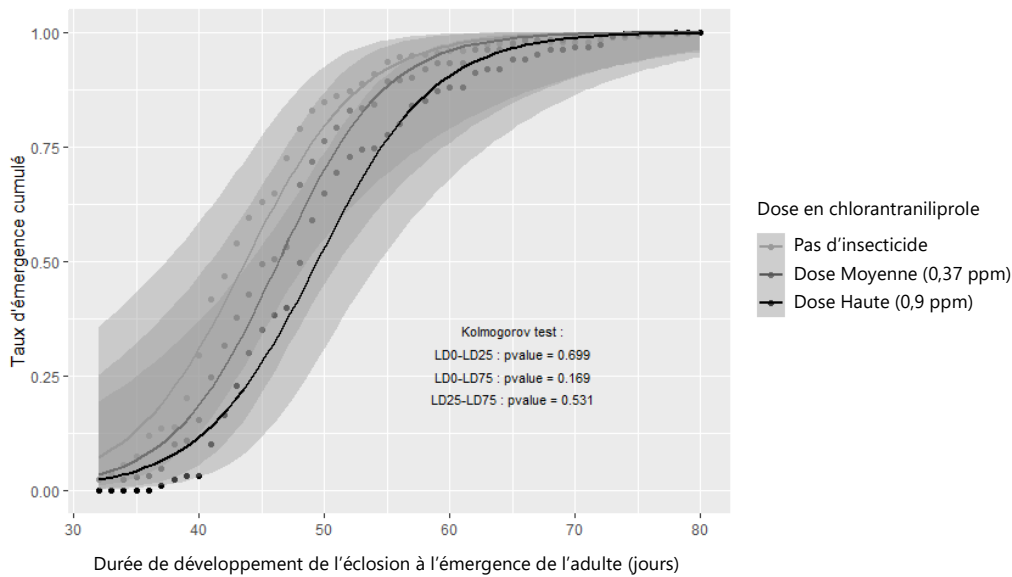


A Lignée DEL – dernière génération (G10)

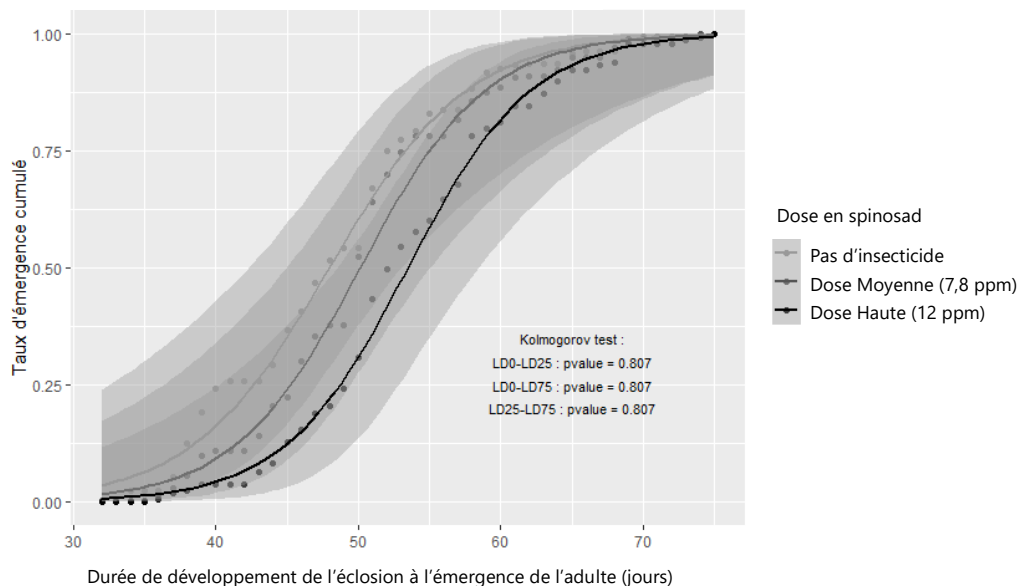


**Figure 17 :** Vitesse de développement de l'éclosion à l'émergence des adultes dans les dernières générations des lignées DEL (A), CHL (B) et SPI (C).

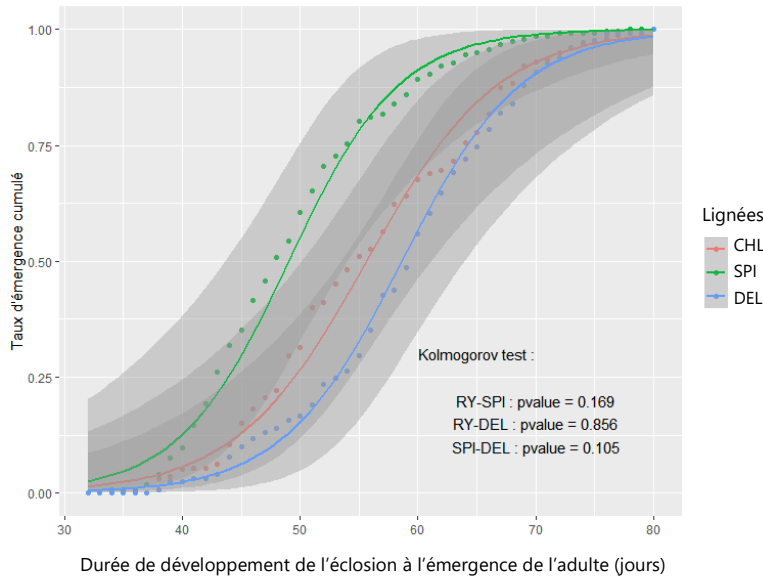
B Lignée CHL – dernière génération (G9)



C Lignée SPI – dernière génération (G9)



### Lignées CHL, DEL et SPI



**Figure 18 :** Durée de développement (en jours) de l'éclosion à l'émergence des adultes dans les différentes lignées soumises à une pression insecticide, lors de la forte pression de sélection (F7 pour CHL et SPI, F8 pour DEL)

## V. Discussion

### a. Optimisation d'élevage dans un objectif d'évolution expérimentale sur lépidoptère

L'élevage de carpocapse des pommes est considéré comme difficile (Dyck, 2010). Une expérimentation d'évolution expérimentale nécessite non seulement d'avoir une production continue d'insecte mais aussi d'avoir des individus en grande quantité et donc un taux de reproduction suffisant pour pouvoir appliquer une pression de sélection. Cette double contrainte nous a conduit à tester différentes conditions d'élevage pour améliorer notre rendement de production d'insectes. Nous avons cherché à : (i) diminuer la mortalité larvaire et (ii) améliorer la fécondité dans nos élevages.

Pour diminuer la mortalité larvaire nous avons testé plusieurs hypothèses :

- La mortalité larvaire est due à l'âge des larves néonates au moment où elles sont déposées à la surface du milieu artificiel
- Le niveau d'hygrométrie dans les piluliers est trop faible pour un bon développement larvaire
- La quantité de levure contenu dans le milieu artificiel est insuffisante au bon développement larvaire
- La colonisation du milieu par la larve est facilitée par une perforation préalable du milieu
- Les larves ayant un réflexe de géotropisme négatif, inverser les tubes (milieu en bas du tube) favorise la colonisation du milieu

Nos résultats montrent que jouer sur les deux premiers paramètres permettent une amélioration significative de la production d'insectes alors que les trois suivants non. En effet, la mortalité larvaire est significativement moindre dans nos expériences lorsque les larves néonates sont prélevées deux fois par jour plutôt qu'une pour être mises en tube. Bien que dans la nature le stade baladeur (suite à l'éclosion) ait été décrit comme pouvant durer jusqu'à 48h (Balachowsky, 1966), il semblerait que l'absence de nourriture dans nos boîtes d'éclosions entraîne l'affaiblissement des larves néonates au-delà de 8h. Nous avons exploré la deuxième hypothèse en augmentant la quantité d'eau disponible pour la larve. Pour cela nous avons utilisé un milieu artificiel gélosé coulés dans des tubes eux-mêmes enfermés dans des boîtes limitant leur dessèchement. Cela nous a permis de diminuer significativement la mortalité

larvaire de nos élevages. Ce résultat est cohérent avec ce qui est décrit dans la littérature. En effet dans leur description détaillée de l'élevage du carpocapse des pommes Guennelon et al., 1981 préconisent une hygrométrie entre 50 et 70% pour un bon développement larvaire. Les autres paramètres testés n'ont pas permis d'améliorer significativement nos rendements de production d'insectes. Ainsi, la complémentation du milieu en levure, la perforation du milieu pour faciliter la pénétration de la larve, le maintien des tubes à l'envers sont des ajustements d'élevages qui n'améliorent pas le rendement.

En ce qui concerne la fécondité dans notre élevage, il a déjà été montré que la reproduction du carpocapse est stimulée quand les individus sont en groupe (Balachowsky, 1966; Borden, 1931; Knight, 2007; Weissling & Knight, 1995). De ce fait, nous avons privilégié une conduite d'élevage en grands groupes lors de la phase d'accouplement. Nous avons donc augmenté le volume des bouteilles de pontes pour qu'elles puissent accueillir un plus grand nombre d'individus, en passant d'une vingtaine d'individus dans 1,5L à une centaine pour 8L.

Toutes ces méthodes mises en place pour diminuer la mortalité larvaire et améliorer la fécondité dans nos élevages nous ont permis de faire augmenter le taux de reproduction d'une génération à une autre de 3,4 fois.

Nous avons également eu besoin de prendre en compte différents paramètres lors de la conception de notre design expérimental. En effet, en suivant les directives et conseils évoqués dans plusieurs revues de littérature et articles traitant des paramètres à considérer lors de la mise en place d'une expérimentation d'évolution expérimentale (Barghi et al., 2020; Kofler & Schlötterer, 2014; Schlötterer et al., 2015) et compte-tenu des contraintes amenées par notre objet d'étude, nous avons décidé de conduire notre expérimentation avec 3 réplicas par lignée, le tout sur 4 à 5 générations. En effet, malgré un temps qui serait considéré comme court pour effectuer une évolution expérimentale et ne permettrait pas de distinguer un signal de sélection (Barrick & Lenski, 2013), notre nombre de réplicas permet d'éviter ce biais tout en diminuant la présence de faux-positifs, pour ainsi augmenter la robustesse de nos résultats, via un croisement de nos analyses par réplica (Kawecki et al., 2012; Kofler & Schlötterer, 2014). De plus, nous avons veillé à garder un effectif efficace conséquent ( $\approx 100$  individus, (Frankham, 1995) au sein des différentes générations de nos lignées et sous-lignées, afin de ne pas épuiser toute la variation génétique (phénomène de dérive génétique) provenant de notre population initiale et introduire un biais expérimental dans nos résultats (Kawecki et al., 2012).



### b. Quel phénotypage choisir ?

Cependant, nous avons pu observer avec nos différents tests de phénotypage que toutes nos lignées n'avaient pas subi de changement de phénotype détectable après application d'une pression de sélection. En effet, même si les lignées Chlorantraniliprole et Deltaméthrine montrent une différence de DL50 entre sous-lignées sélectionnés et non-sélectionnées, la sous-lignée Spinosad ne montre pas de changement quant à sa DL50, malgré une mortalité observée conforme à nos attentes tout au long de l'expérimentation. De plus, aucune des sous-lignées que nous avons testées n'ont montré d'activité enzymatique significativement différente de celle de la lignée témoin et/ou de la souche sensible de référence. Différentes hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat.

Premièrement, les méthodes de phénotypage en elles-mêmes. Même si la méthode que nous utilisons pour phénotyper nos individus lors des bioessais par ingestion se rapproche de celle utilisée lors de l'expérimentation, une des différences majeures réside au niveau du milieu artificiel utilisé. Lors des bioessais en microplaque de titration, nous utilisons du milieu constitué de farine de soja, alors qu'un milieu composé de farine de maïs est utilisé pour l'élevage, ce qui pourrait masquer les effets des pressions de sélection imposées par les substances actives en ayant un impact fort sur les résultats mesurés lors des différents bioessais. En effet, il a pu être montré que les différents milieux artificiels avec lesquels un élevage de carpopapse peut être conduit n'ont pas la même efficacité en termes de survie d'individus et de rendement selon leurs ingrédients principaux. Ainsi, il existe des différences entre milieux à base de farine de soja et de farine de maïs, et même au sein de différents milieux composés de farine de soja : allant de 25% à 90% pour les milieux composés en soja testés, mais restant toujours au-dessus de 77% pour tous les milieux composés de farine de maïs testés (Dyck, 2010). Cependant, cette méthode a été validée à de nombreuses reprises pour le phénotypage de populations de carpopapse (Pons et al., 1999; Reyes et al., 2007; Reyes & Sauphanor, 2008) et reste la méthode de référence pour identifier des populations résistantes (Reyes et al., 2009; Voudouris et al., 2011).

L'autre méthode de bioessais que nous avons utilisée, adaptée à notre expérimentation, illustre également un autre des problèmes que l'on peut avoir lors de la mise en place de bioessais : la variabilité inhérente au travail sur du matériel biologique présente lors des mesures de mortalités. En effet, même si les concentrations déterminées par ces bioessais nous ont permis

d'atteindre nos objectifs en termes de mortalité observée, on peut remarquer qu'il n'y a pas de concordance entre les DL réalisées et la mortalité observée dans nos différentes lignées.

Même si notre méthode a été calibrée pour être optimale pour notre expérimentation, cela pourrait être dû à une diffusion non homogène des substances actives pesticides dans nos tubes (lors de l'expérimentation) ce qui engendrerait une mortalité disparate entre nos différents réplicas. De plus, l'augmentation considérable du nombre d'individus entre nos bioessais de calibration de concentrations et notre expérimentation peut également jouer sur la variabilité de nos résultats.

Il serait ainsi intéressant d'augmenter le nombre d'individus lors des bioessais de calibration et/ou de vérification, ou encore faire des prétests sur des souches de laboratoire déjà connues comme étant résistantes ou sensibles en utilisant d'autres méthodes pour identifier si des corrélations existent entre les différentes méthodes de phénotypage (par exemple la méthode standard en plaques de titration ou des bioessais par contact) entre elles et entre les différents stades possibles de mesure de mortalité.

En ce qui concerne le phénotypage par analyses biochimiques, la méthodologie pourrait également être questionnée. En effet, les individus utilisés lors des mesures sont des individus adultes, alors que la pression de sélection et l'ingestion de substance active s'effectue lors du stade larvaire. Néanmoins, il a été montré que des activités enzymatiques liées à un phénotype résistant peuvent être détectées chez des individus au stade larvaire comme adulte (Ibrahim & Ottea, 1995; Kanga et al., 1997; Karoly et al., 1996) et permettent efficacement de caractériser des populations présentant des phénotypes résistants (R4P Network, 2016).

Il est toutefois important de rappeler que les résultats observés lors des tests biochimiques pourraient être simplement expliqués par les mécanismes impliqués dans le phénotype de résistance : les enzymes de détoxification que nous avons testées pourraient ne pas être à l'origine des phénotypes résistants que l'on observe dans nos lignées et sous-lignées. Comme évoqué précédemment, même si les MFO, CbE et GST font partie des enzymes majeures causant des phénotypes résistants chez les Lépidoptères et le carpocapse, ce ne sont pas les seules (cf. Introduction, partie II.). D'autres enzymes peuvent être impliquées ou d'autres mécanismes peuvent contribuer à la survie des individus, comme une résistance comportementale ou une modification cuticulaire, rendant les individus résistants aux

insecticides, sans toutefois que nos bioessais biochimiques ciblant les enzymes ciblées détectent une activité particulière de celles-ci.

Enfin, comme évoqué précédemment, les paramètres clefs du design expérimental pourraient avoir un impact sur nos résultats et expliquer l'absence de changements au niveau phénotypique (Barrick & Lenski, 2013; Kawecki et al., 2012; Kofler & Schlötterer, 2014). Ici, le temps sur lequel nous avons conduit notre expérimentation (pouvant être considéré comme court) ainsi que la diversité génétique présente dans notre population initiale pourraient avoir eu un impact. Néanmoins, même s'il n'est pas possible de quantifier précisément l'impact des paramètres choisis dans notre design expérimental sur nos résultats de phénotypage, nous avons veillé à ce que ces paramètres soient optimaux au regard de nos contraintes expérimentales.

### c. Effets sub-létaux de l'exposition aux pesticides

Concernant les cinétiques d'émergence entre nos différentes lignées et au cours des générations, il a été surprenant de remarquer des différences significatives entre certaines générations de la lignée Témoin. Ces différences peuvent être dues aux conditions d'élevage au laboratoire qui ont pu être susceptibles de varier dans le temps. En effet, malgré une température et photopériode maintenues constantes dans nos salles d'élevage, il est observé des variations du succès de développement au sein de nos différentes souches de laboratoire au cours de l'année (S. Mauguin, comm. pers.).

La principale hypothèse testée ici était que l'exposition des larves aux différents pesticides entraînaient un retard de développement, et que ce retard soit modulé par la concentration de pesticide. Bien que cet effet ne soit pas toujours significatif, cette tendance a pu être observée pour les 3 substances actives testées. Plus les individus reçoivent une forte dose de traitement insecticide et plus leur émergence est retardée, ce retard de développement pouvant aller jusqu'à 11 jours. Il est cependant important de noter que nous n'avons pu analyser que les données de temps de développement des larves qui ont survécu, le taux de survie variant lui-même très fortement entre lignées et traitements. Les individus survivant au traitement insecticide sont soit résistants, soit tolérants à l'insecticide présent dans leur milieu. Il a ainsi été observé que la vitesse d'émergence des carapocapses est influencée par le dosage du traitement insecticide qu'ils ont reçu. Ainsi, plus les individus sont résistants ou tolérants, plus leur cycle de développement sera long. Concernant les effets des substances actives, on peut

noter une tendance entre le spinosad d'une part et la deltaméthrine et le chlorantraniliprole d'autre part : le spinosad aurait tendance à moins allonger la durée de développement des individus relativement aux deux autres substances. Cela pourrait être expliqué par une différence des durées de rémanence des produits. En effet, le spinosad est connu pour avoir une durée de rémanence plus faible que celles du chlorantraniliprole et de la deltaméthrine (Adak & Mukherjee, 2016; Malhat et al., 2012; Zhang et al., 1984). En ce sens, le milieu amendé avec du spinosad sera moins longtemps toxique que les deux autres substances actives, ce qui pourrait expliquer cette tendance.

L'impact de la résistance aux insecticides sur différents traits d'histoire de vie chez le carpacse ont déjà été mis en évidence par plusieurs études de (Boivin et al., 2001, 2003, 2005)

Dans ces travaux, les effets pléiotropes de la résistance aux insecticides ont été caractérisés et estimés. Il a ainsi été montré que le temps de développement larvaire était significativement plus long dans deux souches résistantes à des insecticides (un benzoylurée et un pyréthriinoïde) par rapport à une souche sensible. De plus, la fertilité et la fécondité de ces souches résistantes étaient plus faibles que celles de la souche sensible. Tous les résultats des deux souches résistantes n'étaient pas significativement différents. D'autres traits d'histoire de vie ont également été évalués dans ces 3 souches, confirmant l'hypothèse d'un compromis physiologique entraînant la résistance dans ces souches. Nos résultats de cinétique d'émergence vont dans ce sens et permettent ainsi de confirmer cette hypothèse.

## Chapitre 2 – Genetic characterization of multiple insecticide resistance in a field population of *Cydia pomonella* (L.) using RNAseq

### Avant-propos

Dans le chapitre précédent, nous avons pu créer 3 lignées par évolution artificielle au laboratoire en soumettant la même population originale à 3 substances actives d'intérêt. Nous avons ensuite phénotypé nos lignées pour évaluer leur niveau de résistance. De façon surprenante, et même si nous avons observé lors de notre expérimentation des taux de mortalité en accord avec les pressions de sélection visées, nos mesures de phénotypage n'ont pas révélé de changements substantiels dans le phénotype de toutes nos lignées. En effet, en ce qui concerne les bioessais par ingestion, seules les lignées chlorantraniliprole et deltaméthrine ont montré un changement par rapport à la souche sensible de référence et entre les sous-lignées F9 ou F10. La lignée spinosad n'a elle pas montré de changement ni par rapport à la souche sensible, ni entre les sous-lignées F9. En ce qui concerne les bioessais par mesure d'activité enzymatique, nous avons pu constater qu'aucune des activités des enzymes dosées n'a été significativement différente de celle de la souche sensible de référence. Il faut cependant noter que la sensibilité et la précision des méthodes de bioessais par ingestions sont assez limitées. Il est par conséquent possible que des changements subtils de sensibilité vis-à-vis des substances actives dans les populations ne soient pas mis en évidence via ces méthodes. Les bioessais mesurant l'activité enzymatique ne ciblent, quant à eux, que certains mécanismes : si les enzymes responsables du phénotype de résistance n'appartiennent pas à ces mécanismes, ils ne seront pas détectés. Afin de contourner ces limitations, une des approches permettant de ne poser qu'un minimum d'*a priori* sur les mécanismes de résistance est le séquençage haut-débit, à l'échelle du génome ou transcriptome entier (Ingham et al., 2021).

L'étude des variations de la transcription des gènes est souvent choisie en première approche pour identifier des gènes d'intérêts à l'échelle du génome. La transcriptomique va permettre à la fois une comparaison quantitative de l'expression des gènes, mais également une analyse qualitative des variants exprimés. Dans le contexte de notre étude, il s'agit de (i) comparer les

changements de profils d'expression de gènes chez des individus issus de nos sous-lignées soumises ou non à une pression de sélection et (ii) de détecter la présence éventuelle dans les gènes exprimés de polymorphismes associés à ces différentes pressions de sélection.

Nous avons séquencé 5 individus en pool issus de chaque sous-lignée (Control (C), Medium Dose (MD), High Dose (HD)) de nos trois lignées des générations F9-10. Après séquençage en DNBseq, nous avons effectué une analyse de comptage de 'reads' avec l'algorithme Salmon et avons estimé l'expression différentielle par une méthode de modélisation par régression linéaire généralisée implémentée dans le package 'edgeR' (Robinson et al., 2010). Pour chaque lignée, des comparaisons indépendantes par paires de sous-lignées ont été réalisées entre la sous-lignée C et les sous-lignées MD et HD. Les gènes présentant un '*fold-change*' supérieur ou inférieur à 3 et une *p-value* inférieure à 0,05 ont été considérés comme différentiellement exprimés. Pour le polymorphisme des transcrits, la détection de variants s'est faite avec le logiciel VarScan (Koboldt et al., 2009). Nous avons ensuite utilisé une approche de filtrage basée sur les changements de fréquences alléliques (d'après (Faucon, 2015)), entre la sous-lignée C et les lignées soumises à pression de sélection (MD et HD), et ce pour les 3 lignées (chlorantraniliprole, deltaméthrine et spinosad).

Ainsi, nous avons pu identifier pour le chlorantraniliprole 39 gènes différentiellement exprimés entre les sous-lignées C et MD, 25 entre les sous-lignées C et HD. Parmi ceux-ci, nous pouvons on trouve notamment des protéines surexprimées dans les sous-lignées MD, impliquées dans la composition et la synthèse de cuticule et un CYP4C1 sous-exprimé. Pour la deltaméthrine, 6 gènes sont différentiellement exprimés entre les sous-lignées C et MD, 15 entre les sous-lignées C et HD ; parmi ces gènes, on peut noter la présence d'une GST surexprimée dans les sous-lignées HD. Enfin, pour le spinosad, 29 gènes sont différentiellement exprimés entre les sous-lignées C et MD, 37 entre les sous-lignées C et HD. Plusieurs P450 sont surexprimés dans les sous-lignées HD : CYP6B5, CYP303A1 et CYP6B2. On retrouve également des protéines impliquées dans la perception de phéromones et d'odeurs qui sont surexprimées. Deux gènes ont été identifiés en communs entre les lignées chlorantraniliprole et spinosad : un récepteur de plasminogène surexprimé dans les sous-lignées MD par rapport aux sous-lignées C et un transcrit n'ayant pas de correspondance avec un gène annoté surexprimé dans les sous-lignées HD par rapport aux sous-lignées C.

Pour ce qui est des polymorphismes dans les transcrits, nous avons pu en identifier différents gènes grâce à leur annotation, mais nous avons également pu identifier des gènes appartenant à une base de données locale de gènes candidats (Siegwart, 2021). Cette liste est basée sur les annotations automatiques du génome correspondant à différents mots-clés associés aux mécanismes de résistance, qui a été ensuite validée manuellement (cf. Chapitre 2, Appendix S3).

Les résultats de ces analyses font l'objet d'un article scientifique publié dans la revue scientifique internationale *Entomologia Generalis* ([doi.org/10.1127/entomologia/2023/2029](https://doi.org/10.1127/entomologia/2023/2029)).

# Genetic characterization of multiple insecticide resistance in a field population of *Cydia pomonella* (L.) using RNAseq

M. Idier<sup>1,2</sup>, M. Siegwart<sup>1</sup>, B. Barrès<sup>2</sup>, S. Maugin<sup>1</sup>, J. Olivares<sup>1</sup> and B. Gauffre<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UR1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles, INRAE, Avignon, France

<sup>2</sup> Université de Lyon, Anses, INRAE, USC CASPER, Lyon, France

Corresponding author: M. Idier. UR1115 Plantes et Systèmes de culture Horticoles, INRAE, F-84914 Avignon cedex, France. [mathilda.idier@gmail.com](mailto:mathilda.idier@gmail.com)

**x**



## Abstract

The codling moth, *Cydia pomonella*, is a major pest of apple and pear orchards. However, with intensive use of pesticide, an increasing number of resistances has been reported. Detoxification is one of the main mechanisms involved in resistance in Lepidoptera, and there is still much to discover about the molecular mechanisms underlying it. This study was conducted to decipher the molecular mechanisms involved in the insecticide resistance of *C. pomonella* and to identify genetic markers associated with resistance upon exposure to several pesticides. To that aim, an experimental evolution was carried out from a wild population resistant to chlorantraniliprole, deltamethrin and spinosad. We generated three lines by combining genetic crosses and experimental selection using three active substances. High throughput RNA-sequencing (RNA-seq) was performed on the three lines to verify whether similar mechanisms were involved in pesticide resistance across lines and to assess the role of detoxification and other mechanisms in resistance. In total, we found 592 mutations and 157 differentially expressed genes. Of the candidate genes identified as involved in resistance, a very limited number were shared between lines. We found in total 20 genes belonging to already known candidate genes, with 2 of them known to be involved in *C. pomonella* resistance (*CYP4C1* and *CYP6B2*) and identified several genes that have never been linked with resistance before (mainly associated with odorant perception and stress).

**Keywords:** Codling moth, insecticide resistance, RNA sequencing, polymorphism, detoxification enzymes, metabolic resistance, transcriptomics, *Tortricidae*

## I. Introduction

Resistance to pesticides is a textbook example of rapid environmental change driven by anthropogenic activity (Palumbi, 2001b). Indeed, a number of different species evolved resistance resulting from the massive application of pesticides (Georghiou, 1990). Understanding the ins and outs of the adaptation to pesticides is a key objective, both from a theoretical and applied point of view, particularly concerning integrated pest management.

The underlying mechanisms involved in insecticide resistance are diverse. They can be sorted into two major classes: mechanisms linked to a modification of the molecular target site of the pesticide (or TSR) and mechanisms that reduce the effective amount of pesticide available to be fixed at the target site (NTSR) (Li et al. 2007). TSR is commonly achieved by mutations in the open reading frame of the target itself, whereas NTSR can be caused by a variety of mechanisms. Behavioural resistance, reduced penetration or metabolic mechanisms such as efflux, sequestration or detoxification (with enhanced activity or overexpression of detoxification enzymes) can all be involved in NTSR (R4P Network, 2016b). When the target of the insecticide is identified, TSR can be easily genotyped and monitored (Boaventura et al. 2020). By contrast, NTSR involves a large number of genes and potentially multiple pathways (Amezian et al. 2021). Knowledge of the genetic bases of NTSR mechanisms is incomplete, especially for non-model species. Identifying the exact genes involved in NTSR and consequently developing molecular tools to monitor NTSR is therefore a challenge (Amezian et al. 2021).

Among the most studied NTSR mechanisms are the detoxification pathways involving enzymes such as cytochromes P450 (P450), glutathione S-transferases (GST), carboxylesterases (CbE), UDP-glucuronosyltransferases (UGT) or transmembrane proteins such as ABC-transporters (Gott et al. 2017; Li et al. 2007). These different proteins belong to pathways that can be activated differently (*e.g.* independently, in parallel or synergistically) depending on the pest species and the insecticide involved (Amezian et al. 2021).

The massive use of various chemical insecticides in the last decades has led pests to combine resistance to several active substances (Georghiou, 1990). Two different genetic determinisms can lead to resistance to several active substances: (i) multiple resistance, which is the result of

an accumulation of several independent resistance alleles, each of them conferring resistance to one active substance, and (ii) cross-resistance, which is the result of one genetic event, where the resistance to several active substances is mediated by a single allele only (R4P Network, 2016b). Because they are less specific, NTSR, including detoxification pathways, might be involved in cross-resistance. From a management perspective, it is important to distinguish multiple resistance from cross-resistance in resistant pest populations.

The codling moth, *Cydia pomonella*, is a major pest of apple and pear orchards present on all continents (Blommers, 1994). Insecticides used to control this pest range from neurotoxics and compounds provoking muscle paralysis (pyrethroids, organophosphates, spinosyns, diamides) to growth regulators (insect growth regulators: juvenile hormones or ecdysone antagonists). Following the intensive use of these products, chemical control failures started to be reported in the 1980s (Reyes et al. 2009). In *C. pomonella*, several TSRs have been documented: such as *kdr* or *MACE*, conferring resistance to pyrethroids and organophosphates, respectively (Brun-Barale et al. 2005, Cassanelli et al. 2006).

Increased activity of different detoxification enzymes, such as mono-oxygenase cytochromes P450, glutathione S-transferases (GST) and esterases (CbE) have also been documented in resistant *C. pomonella* populations (Ju et al. 2021). Using quantitative PCR, studies have investigated variation in expression associated with resistance phenotypes of a handful of targeted genes coding for detoxification enzymes. Regarding P450 genes, overexpression of *CYP6B2*, *CYP4C1* and *CYP4D2* (Dai et al. 2022) or *CYP9A61* (Ju et al. 2021) conferred resistance to pyrethroids and organophosphates. For GST genes, overexpression of *CpGSTd1* or overexpression of *CpGSTd3*, *CpGSTd4* and *CpGSTe3* conferred resistance to pyrethroids (Ju et al. 2021). Last, regarding CbE genes, overexpression of *CpCE-1* conferred resistance to organophosphates and carbamates (Ju et al. 2021). Even though these studies identified candidate genes involved in NTSR mechanisms, they offer only a partial view of the genetic bases involved as they use classical molecular methods, allowing to observe only a few genes involved in one or two insecticide resistances. In addition to that, knowledge about polymorphisms affecting NTSR mechanisms in *C. pomonella* is scarce as opposed to other *Lepidoptera* (Boaventura et al. 2020; He et al. 2012). Indeed, in the codling moth, only Wan et al. (2019) found that the overexpression of *CYP6B2* was associated with 3 SNP in its promoter region.

In this context, the present study aimed at combining experimental evolution and RNA-seq to gain knowledge on gene expression and polymorphism variation associated with resistance to several active substances in *C. pomonella*, without *a priori* on the genes involved. We used a wild population characterized as resistant to several active substances to establish three lines selected with three different insecticide active substances: deltamethrin, a pyrethroid for which gene expression and polymorphism variation involved in NTSR was already documented in *C. pomonella* and other insect species (Ju et al. 2021; Li et al. 2007); chlorantraniliprole, for which a P450 gene was found to be involved in resistance in *Plutella xylostella* (Mallott et al. 2019), where mutations in its promoter region enhance its expression level, and spinosad, where the involvement of different detoxification enzymes has been shown in resistant populations of several insect species (Sparks et al. 2012), but their genetic basis has not yet been studied.

Based on the experimental design of Cattell et al. (2020), we combined genetic crosses with a susceptible strain and gradients of selection to identify variations specifically associated with resistance to each insecticide. This allowed us to test whether common NTSR mechanisms could be at work in resistance to several insecticides (cross-resistance vs multiple resistance). In the case of cross-resistance, we hypothesized that the variation in gene expression and the polymorphism associated with resistance would be shared between the lines. On the contrary, in the case of multiple resistance, our experimental design would allow to segregate specific differential gene expression and polymorphism associated with resistance to each insecticide.

## II. Materials and methods

### a. Population sampling and rearing

During an official insecticide resistance monitoring in France in 2016, a population sampled in a commercial apple orchard in Cavaillon (PACA, FR) was identified as resistant to *Cydia pomonella Granulovrius-M*, thiacloprid, deltamethrin, chlorantraniliprole and phosmet (Table S1, Supplementary Information). Since this population showed signs of resistance to the main modes of action used to control *C. pomonella*, diapausing larvae from this orchard were sampled during autumn 2018 for the purpose of this study.

In the spring of 2019, 1500 emerging adults from the Cavaillon population were allowed to reproduce in the laboratory. After a week of mating, eggs were collected and stored until larvae hatching. First instar larvae were then individually placed in hemolysis tubes filled with artificial rearing diet (Guennelon et al. 1981). Emerging adults were transferred into plastic containers (5L) at a 1:1 male:female ratio for mating. The population was maintained under laboratory conditions ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , RH  $65 \pm 5\%$  and 16:8 L:D h) without any exposure to insecticide for 5 generations to reach a satisfactory growth rate and a sufficient number of individuals to perform the experimental evolution (Table S2, Supplementary Information).

### b. Experimental evolution with three insecticides

The following insecticides were used (commercial formulations): deltamethrin (Decis®, Decis Protech Bayer Sas [ $15 \text{ g.L}^{-1}$ ]), chlorantraniliprole (Coragen®, Coragen Cheminova Agro France SAS [ $200 \text{ g.L}^{-1}$ ]) and spinosad (Success 4®, Success 4 Corteva Agriscience France S.A.S. [ $480 \text{ g.L}^{-1}$ ]). These insecticides were chosen based on several criteria: the Cavaillon population's susceptibility to these active substances, their use in the field and the frequency of resistances in France. Deltamethrin has been used for decades in field and is still being used, despite resistances being reported repeatedly for over 25 years, including TSR and increased activity of detoxification enzymes (Reyes et al. 2009). Chlorantraniliprole is currently used as one of the main control substances in conventional agriculture (Bosch et al. 2018) and only emerging resistances, associated with P450 increased activity, have been observed in the field (Bosch et al. 2018). Spinosad is one of the main control substances used in organic orchards, there is no knowledge of gene expression or polymorphism variation associated with resistance to this active substance as its frequency in the field is rare (Siegwart, pers. comm.). These formulations

were diluted in osmosed water to obtain different concentrations of the insecticide applied on artificial diet during the experimental evolution (Table S3, Supplementary Information).

From generation F6, we created 3 insecticide-selected lines, with 3 replicates per selected line and one line without insecticide selection pressure (*i.e.* 10 lines in total). Each selected line has been fed with diet amended with one insecticide. To this aim, 15 $\mu$ l of the insecticide solution were added on the top of the artificial rearing diet in each tube, then dried before depositing one neonatal larva. Mild and strong selection pressures were applied at generations F6 and F7, respectively (Fig. 1). These smooth selection pressures were chosen to increase the frequency of resistance-conferring alleles while minimizing the probability of eliminating low-effect alleles in our population (Roush & Daly, 1990b). The concentrations of the different insecticide solutions applied for these selection pressures were calculated from tube bioassays performed on individuals of the previous generation (Appendix S1, Supplementary Information). If the selection pressure was unsuccessful, another generation was put under selection. At generation F7, if the mortality induced by the selection pressure corresponds to that expected, surviving adults were crossed with a susceptible strain to segregate the alleles involved in the resistance. This crossing was conducted in order to break genetic linkages and to mitigate false positives coming from potential hitchhiking effects. We also wanted to segregate the associated alleles according to our different lines in case of a multiple resistance, since our lines came from one initial population rather than a composite initial population. Then, each line was allowed to reproduce freely during one generation to avoid applying selection pressure on 100% heterozygotes, and thus be able to maintain recessive alleles conferring resistance. Similarly, 129 individuals from generation F8 of the control line were crossed with 132 individuals from the susceptible strain, to form a hybrid control line. Finally, at generation F9 (F10 for the deltamethrin lines), each line, except the hybrid control line, was randomly divided into 3 sub-lines (27 sub-lines in total) and exposed to a gradient of concentrations of the insecticide used for its selection: no exposure, medium dose (MD) and high dose (HD) (Fig. 1).

The effectiveness of the selection was assessed after each round of selection by calculating the corrected mortality using Abbott's formula. For each F9-10 sub-line, individuals surviving the insecticide treatment were collected at emergence and stored at -80°C until RNA extractions. Microplate ingestion bioassays were conducted to get an indication of the susceptibility of the

initial population to the three insecticides and of the F9-10 sub-lines (Appendix S2, Supplementary Information).

### c. RNA sequencing

For each sub-line (generation F9-10) and the hybrid control line, the thoraxes of five individuals kept at -80°C were pooled and used for the RNA extraction (28 pools in total), using RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, GE). Thoraxes were grounded using a sterile 3.15 mm diameter steel bead on a 1600 MiniG tissue homogenizer (Spex SamplePrep, NJ USA) at 1500 rpm for 15 seconds, in 350µl of RLT buffer. RNA extraction was carried out according to the manufacturer's instructions. Total RNA quality and quantity were assessed with a Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific, MT USA), and integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis. Library preparation, validation and sequencing via DNA nanoball were performed by BGI (Hong Kong).

### d. Data analysis

#### i. RNAseq data

Quality control of the obtained sequences was assessed using FastQC (Babraham Bioinformatics). Sequences were filtered based on their length, pairing and quality with TrimGalore (Babraham Bioinformatics) using the following parameters: stringency: 3, minimum length: 25 bp, trimming of Ns from either side of the reads (--stringency 3 --length 25 --trim-n).

Mapping on the *C. pomonella* reference genome (Wan et al. 2019) was performed with the STAR algorithm (Dobin et al. 2013) with the standard parameters. Transcript discovery was performed using StringTie software (John Hopkins University), using the following parameters: minimum length allowed for the predicted transcripts: 120 bp (-m 120 --rf). Read count was performed using the Salmon algorithm (Patro et al. 2017), using the default parameters, on two datasets: one consisting of all the transcripts found and another consisting of our local resistance candidate genes database (Appendix S3, Supplementary Information). Where available, the gene name and annotation from the reference genome were retrieved under the name cpoXXXXX (as defined in the reference genome). If not, we used the naming convention MSTRG.XXXXX. The annotation of the remaining genes was done by performing a BLAST against the nr database on the NCBI website using the standard parameters (a query coverage percentage and identity of at least 80% and an e-value of less than 0.05).

ii. Differential expression

In order to identify the genes activated or repressed by insecticide ingestion, the differential expression levels were assessed by comparing the read counts across the whole genome, for each selected line independently, between F9-10 control and MD sub-lines, and between F9-10 control and HD sub-lines (*i.e.* 6 independent analyses in total). Differential expression was estimated using the 'edgeR' package with a glm method (quasi-negative binomial model) (Robinson et al. 2010). The control of the false discovery rate for multiple independent test statistics was performed following the Benjamini and Hockberg sequential procedure (Benjamini & Hochberg, 1995). Genes showing a fold change greater than 3 (in either direction) and a significant corrected P-value ( $\alpha < 0.05$ ) were considered differentially expressed.

iii. SNP Filtering and research of variants

Following the method recommended by Faucon et al. (2017), we first filtered data based on quality and coverage: variants were called against the whole *C. pomonella* genome using the VarScan software, version 2.4.2 (Koboldt et al. 2012), with the following parameters: locus coverage > 20 in all conditions, ignore loci with average base quality < 20, ignore reads with mapping quality  $\leq 20$  and ignore variants with less than 5% supporting reads. Then, for each selected line separately, we applied the following pipeline to filter polymorphisms linked with selection pressure according to their frequency.

$[F_{\text{SNP (hybrid control line)}} < F_{\text{SNP (F9-10 no exposure)}}]$  in at least 2 lines

AND

$[F_{\text{SNP (F9-10 medium LD)}} < 15 \text{ AND } F_{\text{SNP (F9-10 high LD)}} < 15]$  in 2 lines

AND

$[F_{\text{SNP (F9-10 medium LD)}} < 15 \text{ OR } F_{\text{SNP (F9-10 high LD)}} < 15]$  in the 3<sup>rd</sup> lines

The frequency of alleles positively associated with resistance was expected to increase from the hybrid control line to the unexposed F9-10 individuals and to increase from the F9-10 unexposed individuals to the F9-10 exposed to a medium and a high LD. The frequency of alleles negatively associated with resistance was expected to behave reciprocally. To take into account the possible effect of the low number of individuals pooled randomly in each sample on the outcome of the variation of the frequency in a single sample, the possibility for one of



the three lines not to follow the expected evolution of allele frequencies was allowed. Then, to determine the effect of polymorphisms in our transcriptomic data, coding effects of SNPs were predicted using SnpEff 5.0c (Cingolani et al. 2012). Variants were categorized as synonymous, non-synonymous, upstream, downstream and according to their localization. Finally, we performed a BLAST of this list against our candidate gene database of genes associated with resistance.

### III. Results

#### a. Experimental evolution

For the first generation of selection (F6), corrected mortality (CM) ranged from 7.83 to 29.9%, thus consistent with the mild selection pressure targeted in our experimental design (Fig. S1, Supplementary Information). For the second generation of selection (F7), CMs of the spinosad and chlorantraniliprole selected lines were 72.4% and 73.8%, respectively, thus the strong selection was considered effective. By contrast, selection on the deltamethrin-selected lines led to a 12.5% corrected mortality, which was much lower than intended. A third round of selection was thus applied to the deltamethrin-selected lines (F8, Fig. 1) and led to a corrected mortality of 62.9%. Mortalities in sub-lines of the F9-10 generations were for chlorantraniliprole, spinosad and deltamethrin 52.9%, 43.2% and 48.2% for medium dose and 78.3%, 70.6% and 93.5% for high dose, respectively (Fig. S1, Supplementary Information). Bioassays performed on the initial generation (P0) confirmed 2017 results for deltamethrin, with a significant difference in mortality compared to the susceptible reference (LD50 P-value < 0.001) and a resistance ratio (RR50) of 13.07. Conversely, the 2017 resistance to chlorantraniliprole was not confirmed (LD50 P-value = 0.1807, RR50 = 1.06). Last, for spinosad that was not tested in 2017, we found a weak signal of resistance (LD50 P-value < 0.039, RR = 1.66). As expected, following the crossing with the susceptible reference strain, F9-10 RR50 decreased and the LD50 were not significantly different among control, medium LD and high LD sub-lines. However, we observed that RR increased with exposition to pesticides in F9-10 sub-lines (Table S4, Supplementary Information).

#### b. Sequencing metrics and parameters

The DNB sequencing allowed us to obtain an average of  $46 \times 10^6$  150-bp reads per sample with a mean coverage of 45X. (see details per sub-line in Table S5, Supplementary Information). Filtering them according to read pairing, sequencing quality and mapping accuracy allowed for over 80% of the total reads to be successfully mapped on the *C. pomonella* genome.

#### c. Differentially expressed genes

Overall, we identified 80 differentially expressed genes between the control and medium LD sub-lines, and 77 differentially expressed genes between the control and high LD sub-lines ( $|\log_2FC| > 1.5$  and FDR < 0.05) (Fig. S2, Supplementary Information). We found no differentially

expressed genes in common between deltamethrin, spinosad and chlorantraniliprole selected lines.

More specifically, for the deltamethrin-selected lines, 3 genes were overexpressed and 3 underexpressed between the control and medium LD sub-lines. All of them were uncharacterized or hypothetical proteins. Between the control and high LD sub-lines, 8 genes were overexpressed and 7 underexpressed. Among them, 12 were identified, including a glutathione S-transferase 1 involved in detoxification mechanisms (cpo154510) which was overexpressed.

For the chlorantraniliprole-selected lines, 24 genes were overexpressed and 18 underexpressed between the control and medium LD sub-lines. Among them, 12 were identified, such as a cuticle protein (MSTRG.06627), an endochitinase (cpo145340), a pupal cuticle protein (cpo162620), which play a part in cuticle synthesis and composition and were all overexpressed. Between the control and high LD sub-lines, 15 genes were overexpressed and 10 underexpressed. Among them, two genes involved in detoxification mechanisms were identified: CYP4C1 (cpo142370) and a farnesoate epoxidase (cpo111450) which were underexpressed and overexpressed, respectively. Several genes involved in stress or immune response were also overexpressed between the sub-lines (Fig 2).

Between the control and medium LD spinosad sub-lines, 24 and 8 genes were overexpressed and underexpressed, respectively. Among them, 11 were identified, such as a CYP6B5 (MSTRG.09738) and a probable CYP303A1 (cpo122510) involved in detoxification, over and underexpressed, respectively. Between the control and high LD sub-lines, 22 genes were overexpressed and 15 underexpressed, including CYP6B2 (cpo040630) which was overexpressed: Overall, we also found genes involved in olfactory and pheromone systems overexpressed.

Interestingly, we found genes involved in immunity over and underexpressed for the three insecticide-selected lines and genes involved in pheromone perception in chlorantraniliprole-selected and spinosad-selected lines (Fig. 2).

#### d. Detection of transcript polymorphism

Overall, 592 polymorphisms were identified with filters based on the frequency of mutations: 156, 208 and 228 for the deltamethrin, chlorantraniliprole and spinosad selected lines,

respectively. None was common to the 3 insecticides (Fig. S3, Supplementary Information). Three were common to the deltamethrin and spinosad selected lines (including a CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein, cpo059390, which seems to play a role in the immune system) and 4 were common to the chlorantraniliprole and spinosad selected-lines (Table S6, Supplementary Information).

More genes were affected in the chlorantraniliprole selected line (N = 60) compared to the deltamethrin and spinosad selected lines (N = 38 and 31, respectively) and there was a similar proportion of missense variants considered to have a moderate impact in the final protein (Table 1).

For the deltamethrin-selected lines, 4 candidate genes were affected: 2 cuticle proteins (cpo098380 and cpo039980) were affected, as well as one NADPH-cytochrome P450 reductase (cpo060030) and one ATP-binding cassette (cpo136030), which presented 2 SNP next to each other (Table S7, Supplementary Information). Regarding the chlorantraniliprole-selected lines, 4 candidate genes were affected by these mutations: 2 ATP binding cassettes (cpo053890 and cpo138210), one heat shock factor binding protein 1 (cpo066900) and one NADH dehydrogenase (cpo070030) (Table S7, Supplementary Information). Last, for spinosad, the candidate genes impacted were: an esterase B1 (cpo113930), a NADPH cytochrome P450 reductase (cpo060030), a multidrug resistance protein homolog (cpo124940), a heat shock protein (cpo057810) and a NADH dehydrogenase (cpo127980) (Table S7, Supplementary Information).

## IV. Discussion

So far, the attention of most studies investigating *C. pomonella* resistances molecular mechanisms has been set on the effect of a few genes with major phenotypic effects (Bosch et al. 2018). However, with decreasing insecticide pressures, other mechanisms conferring resistance are evolving, with an accumulation of genes having a minor effect on the final resistant phenotype (Roush & Daly, 1990b). Associated with the democratization of NGS, this leads to a change of methodology in characterizing the underlying molecular mechanisms at play in resistance, as well in the development of new detection tools to assess resistance in field populations (Faucon et al. 2017; Ingham et al. 2021).

Our original hypothesis was that cross-resistance in our original population was due to NTSR and that detoxification enzymes would be involved, as it had been already observed in *C. pomonella* (Reyes et al. 2009; Wan et al. 2019). Surprisingly, out of the 157 differentially expressed genes, only 4 were detoxification genes and only one polymorphism was found in a detoxification gene. A large proportion of differentially expressed genes and polymorphisms associated with resistance were found in genes for which no annotation was available. Altogether, our results indicate a complex tangle of mechanisms involving efflux, cuticle thickening, metabolism and detoxification. The low number of genes and polymorphisms identified as involved in a response to selection could be related to the stringency of our approach that combined three biological replicates for each insecticide-selected line in our experimental design.

Results also support that multiple resistances rather than cross-resistances were more likely involved in the observed resistance phenotype to several insecticides in the initial population. Indeed, no shared differential gene expression or transcript polymorphism was observed among the three lines. Despite the original population being resistant to deltamethrin and spinosad, we did not find shared differential expression or polymorphisms common to the deltamethrin and spinosad-selected lines only. Hardly two genes with differential expression (a plasminogen receptor, which seems to play a role in inflammatory responses, and a gene without annotation) and seven polymorphisms were common to chlorantraniliprole and deltamethrin or chlorantraniliprole and spinosad-selected lines, none was present in our candidate gene database.

Interestingly, while the resistance to deltamethrin had the highest resistance ratio in the original population, differential expression affected 3 times fewer genes and there were 40% fewer polymorphisms associated with resistance in the deltamethrin-selected lines. This might be due to the presence at a low frequency of the TSR *kdr* mutation whose frequency was estimated at 33 % in the original population (data not shown). We did not however find *kdr* mutation in transcripts of the selected lines.

Several genes were found to be specifically differentially expressed in each selected line. Among those genes, a number of them were from gene families already identified in the literature as being involved in detoxification mechanisms. We found two P450 genes differentially expressed, *CYP4C1* (cpo142370, in the chlorantraniliprole lines) and *CYP6B2* (cpo040630, in the spinosad lines), that were previously found positively selected in a pyrethroid and an organophosphate resistant strains *C. pomonella* (Dai et al. 2022). Interestingly, the pyrethroid-resistant strain was originating from the same area in the south of France as our initial population. However, the *CYP6B2* gene copy is different between the two studies. *CYP4C1* which was characterized by a high expression level in larvae in Dai et al. (2022) was found underexpressed in adults of our study. This underlines the interest in performing RNAseq on various life stages. We also found a GST gene, the glutathione-S-transferase-1 (cpo154510) overexpressed in the deltamethrin line. Other GST genes were previously found overexpressed in *C. pomonella* following exposure to several pyrethroids (Ju et al. 2021).

Surprisingly, the majority of genes that were differentially expressed (110 out of 151) were not included in our candidate genes database. This result supports our strategy to explore the full genome of *C. pomonella* rather than focus on a list of candidate genes. It also suggests that our understanding of the molecular mechanisms at play in insect resistances might be still limited. Genes involved in stress and immune response were particularly represented in the pool of differentially expressed genes for the three insecticides. Pesticides can alter several different pathways and components in the different immunity responses in insects (James & Xu, 2012). In our study, an inducible metalloproteinase inhibitor protein, involved in humoral immune response was overexpressed. Interaction between insecticides and some components of the humoral immune response has been observed, where the insecticide amplifies gene expression (Dimarcq et al. 1997). A phenoloxidase, which plays a role in the melanisation process, was also underexpressed in the deltamethrin selected line. The phenoloxidase cascade

activity has already been documented as being affected in the presence of insecticides (James & Xu, 2012), and the exposition of sublethal doses of deltamethrin on *Spodoptera litouralis* individuals caused an underexpression of phenoloxidase. (Lalouette et al. 2016). Genes involved in the olfactory system were also differentially expressed. Interestingly, insecticide exposure has been shown to directly affect odorant-binding proteins, where exposure to a high dose of permethrin resulted in overexpression of an odorant-binding protein in *P. xylostella* (Bautista et al. 2015).

It is also worth noting that the differentially expressed genes in medium- and high-LD sub-lines were not the same. This result suggests that the nature of differentially expressed genes might change with the intensity of selective pressure. The fact that the biological responses differ according to the intensity of insecticide pressure is already known. It can even lead to an improvement in fitness at very low doses, a phenomenon known as hormesis (Cutler & Guedes, 2017b).

None of the identified polymorphisms of interest was located in the 74 genes found to be differentially expressed. Mutations affecting transport proteins and intermediary metabolism (ATP binding cassettes, NADH dehydrogenases, NADPH-cytochrome P450 reductase) were found to be associated with resistance to the three insecticides. ATP-binding cassettes have already been described as involved in chlorantraniliprole resistance in several insect species (Peng et al. 2021; Shan et al. 2021), as well as in deltamethrin resistance in *C. pomonella* (Dai et al. 2022). In the deltamethrin and spinosad selected lines, we detected polymorphisms located in the same gene coding for a NADPH-cytochrome P450 reductase, which has already been described as involved in deltamethrin resistance in *Cimex lectularius* (Zhu et al. 2012). SNPs were also present on several cuticle proteins in the deltamethrin-selected lines. This has already been described in deltamethrin-resistant mosquitoes (Bonizzoni et al. 2015). The role of cuticle proteins in insecticide resistance in *C. pomonella* has also already been suggested in several studies (Dai et al. 2022; Wan et al. 2019). Also, a multidrug resistance protein was affected by polymorphisms in the spinosad-selected lines. The implication of this category of protein has been shown in several resistant phenotypes: in organophosphate and carbamate-resistant *Helicoverpa armigera* individuals (Akbar et al. 2014) and in deltamethrin-resistant *Trichoplusia ni* individuals (Simmons et al. 2013). A SNP has also been located in a gene coding

for an esterase in our deltamethrin-selected lines, which was also described in *Anopheles gambiae* as involved in pyrethroid resistance (Weetman et al. 2018).

This study contributes to a better understanding of the complex mechanisms associated with insecticide resistance and provides resistance-related candidate markers that might be used to develop new resistance detection tools. Since it is generally conducted on small laboratory populations, artificial selection is expected to be biased towards the selection for polygenic resistance rather than a rare monogenic one (ffrench-Constant, 2013; Georghiou, 1990; Roush & McKenzie, 1987). However, we used a wild population that has been exposed to pesticides for many generations in the field and has evolved resistance to several insecticides prior to being artificially selected on the very same insecticides. We also made sure our initial population and the experimental lines' population sizes were as large as possible to mitigate this potential bias (Table S2, Supplementary Information). It would also have been interesting to conduct this experiment on a greater number of generations, even though our goal was not to create lines with high levels of resistance but rather to create a gradient of resistance level amongst the final generation of our sub-lines.

Furthermore, to better characterize their implication in resistant phenotypes, functional validation of these markers would be needed. A complementary approach to this work would be to carry on a DNA-sequencing-based study. Indeed, combining genomic and transcriptomic studies provides a broader view of the mechanisms at work in insecticide resistance, and might help to identify the underlying causes of differential gene expression involved in resistance (Faucon et al. 2017; Ingham et al. 2021).



## **Acknowledgements**

We thank Dr Jean-Philippe David for his helpful discussions and critical comments on the manuscript. We are grateful to the genotoul bioinformatics platform Toulouse Occitanie (Bioinfo Genotoul, <https://doi.org/10.15454/1.5572369328961167E12>) for providing computing and storage resources. This project was funded and supported by ANSES (grant agreement no. PPV/2020) via the tax on sales of plant protection products. The proceeds of this tax are assigned to ANSES to finance the establishment of the system for monitoring the adverse effects of plant protection products, called 'phytopharmacovigilance' (PPV), established by the French Act of the future of agriculture of 13 October 2014.

## References

- Adak, T., & Mukherjee, I. (2016). Investigating Role of Abiotic Factors on Spinosad Dissipation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(1), 125-129.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-015-1644-z>
- Agrawal, A., Ramasamy, G. G., Pathak, J., Nayyar, N., Muthugounder, M., Maria, P., Rai, A., & Thiruvengadam, V. (2022). Deciphering the Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance From the Transcriptome Data of Field Evolved Spinosad Resistant and Susceptible Populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 115(4), 1268-1278. <https://doi.org/10.1093/jee/toac072>
- Ahn, S.-J., Vogel, H., & Heckel, D. G. (2012). Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(2), 133-147. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.11.006>
- Akbar, S. M., Aurade, R. M., Sharma, H. C., & Sreeramulu, K. (2014). Mitochondrial P-Glycoprotein ATPase Contributes to Insecticide Resistance in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera). *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(1), 651-660. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-9969-5>
- Aliferis, K. A., & Chrysayi-Tokousbalides, M. (2011). Metabolomics in pesticide research and development: Review and future perspectives. *Metabolomics*, 7(1), 35-53.  
<https://doi.org/10.1007/s11306-010-0231-x>
- Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2011). Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides: A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(2), 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.03.004>

- Amezian, D., Nauen, R., & Le Goff, G. (2021a). Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification genes in insects—An overview. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 174, 104822. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104822>
- Amezian, D., Nauen, R., & Le Goff, G. (2021b). Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification genes in insects—An overview. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 174, 104822. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104822>
- Assogba, B. S., Djogbénu, L. S., Milesi, P., Berthomieu, A., Perez, J., Ayala, D., Chandre, F., Makoutodé, M., Labbé, P., & Weill, M. (2015). An ace-1 gene duplication resorbs the fitness cost associated with resistance in *Anopheles gambiae*, the main malaria mosquito. *Scientific Reports*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep14529>
- Baccarelli, A., & Bollati, V. (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Current Opinion in Pediatrics*, 21(2), 243-251. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32832925cc>
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., & Vontas, J. (2018). Insect cuticle: A critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.03.001>
- Balachowsky, A. S. (1966). Entomologie appliquée à l'agriculture. Tome II, Lépidoptères. *Ed. Masson et Cie Paris*, 2(Lépidoptères). <https://bibliotheques.mnhn.fr/medias/doc/exploitation/HORIZON/457917/entomologie-appliquee-a-l-agriculture-tome-ii-lepidopteres-premier-volume-hepialoidea-stigmelloidea->
- Barghi, N., Hermisson, J., & Schlötterer, C. (2020). Polygenic adaptation: A unifying framework to understand positive selection. *Nature Reviews Genetics*, 21(12), 769-781. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0250-z>

- Barrett, R. D. H., & Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(1), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.008>
- Barrick, J. E., & Lenski, R. E. (2013). Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics*, 14(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nrg3564>
- Bass, C., & Field, L. M. (2011). Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Management Science*, 67(8), 886-890. <https://doi.org/10.1002/ps.2189>
- Bass, C., Puinean, A. M., Zimmer, C. T., Denholm, I., Field, L. M., Foster, S. P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., & Williamson, M. S. (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 51, 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.003>
- Battlay, P., Schmidt, J. M., Fournier-Level, A., & Robin, C. (2016). Genomic and Transcriptomic Associations Identify a New Insecticide Resistance Phenotype for the Selective Sweep at the Cyp6g1 Locus of *Drosophila melanogaster*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 6(8), 2573-2581. <https://doi.org/10.1534/g3.116.031054>
- Bautista, M. A. M., Bhandary, B., Wijeratne, A. J., Michel, A. P., Hoy, C. W., & Mittapalli, O. (2015a). Evidence for trade-offs in detoxification and chemosensation gene signatures in *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, 71(3), 423-432. <https://doi.org/10.1002/ps.3822>
- Bautista, M. A. M., Bhandary, B., Wijeratne, A. J., Michel, A. P., Hoy, C. W., & Mittapalli, O. (2015b). Evidence for trade-offs in detoxification and chemosensation gene signatures in *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, 71(3), 423-432. <https://doi.org/10.1002/ps.3822>

- Beers, E. H., Suckling, D. M., Prokopy, R. J., & Avilla, J. (2003). Ecology and management of apple arthropod pests. In D. C. Ferree & I. J. Warrington (Éds.), *Apples: Botany, production and uses* (p. 489-519). CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851995922.0489>
- Belinato, T. A., Martins, A. J., Belinato, T. A., & Martins, A. J. (2016). Insecticide Resistance and Fitness Cost. In *Insecticides Resistance*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61826>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- Blommers, L. H. M. (1994). Integrated Pest Management in European Apple Orchards. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 213-241.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001241>
- Boaventura, D., Martin, M., Pozzebon, A., Mota-Sanchez, D., & Nauen, R. (2020). Monitoring of Target-Site Mutations Conferring Insecticide Resistance in *Spodoptera frugiperda*. *Insects*, 11(8), 545. <https://doi.org/10.3390/insects11080545>
- Bock, K. W. (2016). The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants: Animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochemical Pharmacology*, 99, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.001>
- Boivin, T., Bouvier, J. C., Chadœuf, J., Beslay, D., & Sauphanor, B. (2003). Constraints on adaptive mutations in the codling moth *Cydia pomonella* (L.): Measuring fitness trade-offs and natural selection. *Heredity*, 90(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800188>
- Boivin, T., Chadœuf, J., Bouvier, J.-C., Beslay, D., & Sauphanor, B. (2005). Modelling the interactions between phenology and insecticide resistance genes in the codling moth

*Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, 61(1), 53-67.

<https://doi.org/10.1002/ps.945>

Boivin, T., D'Hières, C. C., Bouvier, J. C., Beslay, D., & Sauphanor, B. (2001). Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomologia*

*Experimentalis et Applicata*, 99(3). <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00838.x>

Bonizzoni, M., Ochomo, E., Dunn, W. A., Britton, M., Afrane, Y., Zhou, G., Hartsel, J., Lee, M.-C.,

Xu, J., Githeko, A., Fass, J., & Yan, G. (2015). RNA-seq analyses of changes in the

*Anopheles gambiae* transcriptome associated with resistance to pyrethroids in Kenya:

Identification of candidate-resistance genes and candidate-resistance SNPs. *Parasites*

*& Vectors*, 8(1), 474. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1083-z>

Borden, A. D. (1931). Some Field Observations On Codling Moth Behavior. *Journal of*

*Economic Entomology*, 24(6), 1137-1145. <https://doi.org/10.1093/jee/24.6.1137>

Bosch, D., Rodríguez, M. A., & Avilla, J. (2018). Monitoring resistance of *Cydia pomonella* (L.)

Spanish field populations to new chemical insecticides and the mechanisms involved.

*Pest Management Science*, 74(4), 933-943. <https://doi.org/10.1002/ps.4791>

Brogdon, W. G. (1989). Biochemical resistance detection: An alternative to bioassay.

*Parasitology Today*, 5(2), 56-60. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90192-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90192-0)

Buès, R., Bouvier, J. C., & Boudinhon, L. (2005). Insecticide resistance and mechanisms of

resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in the south of France. *Crop Protection*, 24(9), 814-820.

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.006>

Cassanelli, S., Reyes, M., Rault, M., Carlo Manicardi, G., & Sauphanor, B. (2006).

Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling

moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8), 642-653.

<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.05.007>

Cattel, J., Faucon, F., Le Péron, B., Sherpa, S., Monchal, M., Grillet, L., Gaude, T., Laporte, F.,

Dusfour, I., Reynaud, S., & David, J. (2020a). Combining genetic crosses and pool

targeted DNA-seq for untangling genomic variations associated with resistance to

multiple insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*. *Evolutionary Applications*, 13(2),

303-317. <https://doi.org/10.1111/eva.12867>

Cattel, J., Faucon, F., Le Péron, B., Sherpa, S., Monchal, M., Grillet, L., Gaude, T., Laporte, F.,

Dusfour, I., Reynaud, S., & David, J. (2020b). Combining genetic crosses and pool

targeted DNA-seq for untangling genomic variations associated with resistance to

multiple insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*. *Evolutionary Applications*, 13(2),

303-317. <https://doi.org/10.1111/eva.12867>

Chen, E.-H., & Hou, Q.-L. (2021). Identification and expression analysis of cuticular protein genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae).

*Pesticide Biochemistry and Physiology*, 178, 104943.

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104943>

Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Land, S. J., Lu, X., & Ruden,

D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide

polymorphisms, SnpEff. *Fly*, 6(2), 80-92. <https://doi.org/10.4161/fly.19695>

Collins, E. L., Phelan, J. E., Hubner, M., Spadar, A., Campos, M., Ward, D., Acford-Palmer, H.,

Gomes, A. R., Silva, K., Ferrero Gomez, L., Clark, T. G., & Campino, S. (2022). A next

generation targeted amplicon sequencing method to screen for insecticide resistance

mutations in *Aedes aegypti* populations reveals a *rdl* mutation in mosquitoes from

Cabo Verde. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(12), e0010935.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010935>

Collotta, M., Bertazzi, P. A., & Bollati, V. (2013). Epigenetics and pesticides. *Toxicology*, 307, 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.017>

Cutler, G. C. (2013). Insects, Insecticides and Hormesis: Evidence and Considerations for Study. *Dose-Response*, 11(2), dose-response.12-008.Cutler.

<https://doi.org/10.2203/dose-response.12-008.Cutler>

Cutler, G. C., & Guedes, R. N. C. (2017a). Occurrence and Significance of Insecticide-Induced Hormesis in Insects. In S. O. Duke, P. Kudsk, & K. Solomon (Éds.), *ACS Symposium Series* (Vol. 1249, p. 101-119). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2017-1249.ch008>

Cutler, G. C., & Guedes, R. N. C. (2017b). Occurrence and Significance of Insecticide-Induced Hormesis in Insects. In S. O. Duke, P. Kudsk, & K. Solomon (Éds.), *ACS Symposium Series* (Vol. 1249, p. 101-119). American Chemical Society.

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2017-1249.ch008>

Daborn, P. J., Yen, J. L., Bogwitz, M. R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T. G., & ffrench-Constant, R. H. (2002). A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in *Drosophila*. *Science*, 297(5590), 2253-2256. <https://doi.org/10.1126/science.1074170>

Dai, W.-T., Li, J., & Ban, L.-P. (2022a). Genome-Wide Selective Signature Analysis Revealed Insecticide Resistance Mechanisms in *Cydia pomonella*. *Insects*, 13(1), 2.

<https://doi.org/10.3390/insects13010002>



- Dai, W.-T., Li, J., & Ban, L.-P. (2022b). Genome-Wide Selective Signature Analysis Revealed Insecticide Resistance Mechanisms in *Cydia pomonella*. *Insects*, *13*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/insects13010002>
- Denholm, I., Pickett, J. A., Devonshire, A. L., Bergé, J., Feyereisen, R., & Amichot, M. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *353*(1376), 1701-1705. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0321>
- Dermauw, W., Osborne, E., Clark, R. M., Grbić, M., Tirry, L., & Van Leeuwen, T. (2013). A burst of ABC genes in the genome of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *BMC Genomics*, *14*(1), 317. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-317>
- Dermauw, W., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>
- Dermauw, W., Van Leeuwen, T., & Feyereisen, R. (2020). Diversity and evolution of the P450 family in arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *127*, 103490. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103490>
- Devonshire, A. L., & Field, L. M. (1991). Gene Amplification and Insecticide Resistance. *Annual Review of Entomology*, *36*(1), 1-21. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.000245>
- Devonshire, A. L., Heidari, R., Bell, K. L., Campbell, P. M., Campbell, B. E., Odgers, W. A., Oakeshott, J. G., & Russell, R. J. (2003). Kinetic efficiency of mutant carboxylesterases implicated in organophosphate insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *76*(1), 1-13. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00054-3)

- Dimarcq, J.-L., Imler, J.-L., Lanot, R., Alan B. Ezekowitz, R., Hoffmann, J. A., A. Janeway, C., & Lagueux, M. (1997). Treatment of l(2)mbn *Drosophila* tumorous blood cells with the steroid hormone ecdysone amplifies the inducibility of antimicrobial peptide gene expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(10), 877-886.  
[https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00072-6](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00072-6)
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Douris, V., Denecke, S., Van Leeuwen, T., Bass, C., Nauen, R., & Vontas, J. (2020). Using CRISPR/Cas9 genome modification to understand the genetic basis of insecticide resistance: *Drosophila* and beyond. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 167, 104595. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104595>
- Dyck, V. A. (2010). *Rearing codling moth for the sterile insect technique*. Food and Agriculture Organization.
- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1), 3-8.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x>
- Farnsworth, C. A., Teese, M. G., Yuan, G., Li, Y., Scott, C., Zhang, X., Wu, Y., Russell, R. J., & Oakeshott, J. G. (2010). Esterase-based metabolic resistance to insecticides in heliothine and spodopteran pests. *Journal of Pesticide Science*, 35(3), 275-289.  
<https://doi.org/10.1584/jpestics.R10-13>
- Faucon, F. (2015). *Etude des mécanismes de résistance du moustique Aedes aegypti aux insecticides pyréthrinoïdes: Apports des nouvelles technologies de séquençage ADN à l'identification de nouveaux marqueurs de résistance. UV light and urban pollution: Bad*

- cocktail for mosquitoes? Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UVA* Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito [These de doctorat, Université Grenoble Alpes (ComUE)]. <https://theses.fr/2015GREAV027>
- Faucon, F., Gaude, T., Dusfour, I., Navratil, V., Corbel, V., Juntarajumnong, W., Girod, R., Poupardin, R., Boyer, F., Reynaud, S., & David, J.-P. (2017). In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti*: An integrated next-generation sequencing approach. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11*(4), e0005526. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005526>
- Feyereisen, R. (1995). Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology Letters*, *82-83*, 83-90. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03470-6](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03470-6)
- Feyereisen, R. (2006). Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions*, *34*(6), 1252-1255. <https://doi.org/10.1042/BST0341252>
- ffrench-Constant, R. H. (2013). The molecular genetics of insecticide resistance. *Genetics*, *194*(4), 807-815. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.141895>
- ffrench-Constant, R. H., & Bass, C. (2017). Does resistance really carry a fitness cost? *Current Opinion in Insect Science*, *21*, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.011>
- Field, L. M., Blackman, R. L., Tyler-Smith, C., & Devonshire, A. L. (1999). Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, *339*(3), 737-742. <https://doi.org/10.1042/bj3390737>
- Field, L. M., & Devonshire, A. L. (1997). Structure and organization of amplicons containing the E4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, *322*(3), 867-871. <https://doi.org/10.1042/bj3220867>

- Frankham, R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife: A review. *Genetics Research*, 66(2), 95-107. <https://doi.org/10.1017/S0016672300034455>
- Gao, Y., Kim, K., Kwon, D. H., Jeong, I. H., Clark, J. M., & Lee, S. H. (2018). Transcriptome-based identification and characterization of genes commonly responding to five different insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.007>
- Gautier, M. (2015). Genome-Wide Scan for Adaptive Divergence and Association with Population-Specific Covariates. *Genetics*, 201(4), 1555-1579. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.181453>
- Gautier, M., Vitalis, R., Flori, L., & Estoup, A. (2022). F-Statistics estimation and admixture graph construction with Pool-Seq or allele count data using the R package poolstat. *Molecular Ecology Resources*, 22(4), 1394-1416. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13557>
- Georghiou, G. P. (1990). Overview of Insecticide Resistance. In M. B. Green, H. M. LeBaron, & W. K. Moberg (Éds.), *Managing Resistance to Agrochemicals: From Fundamental Research to Practical Strategies* (Vol. 421). American Chemical Society. <https://pubs.acs.org/doi/book/10.1021/bk-1990-0421>
- Goh, D. K. S., Anspaugh, D. D., Motoyama, N., Rock, G. C., & Roe, R. M. (1995). Isolation and Characterization of an Insecticide-Resistance-Associated Esterase in the Tobacco Budworm *Heliothis virescens* (F.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51(3), 192-204. <https://doi.org/10.1006/pest.1995.1019>
- Gott, R. C., Kunkel, G. R., Zobel, E. S., Lovett, B. R., & Hawthorne, D. J. (2017a). Implicating ABC Transporters in Insecticide Resistance: Research Strategies and a Decision Framework. *Journal of Economic Entomology*, 110(2), 667-677. <https://doi.org/10.1093/jee/tox041>

- Gott, R. C., Kunkel, G. R., Zobel, E. S., Lovett, B. R., & Hawthorne, D. J. (2017b). Implicating ABC Transporters in Insecticide Resistance: Research Strategies and a Decision Framework. *Journal of Economic Entomology*, 110(2), 667-677. <https://doi.org/10.1093/jee/tox041>
- Grant, D. F., & Hammock, B. D. (1992). Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Molecular and General Genetics MGG*, 234(2), 169-176. <https://doi.org/10.1007/BF00283836>
- Groeters, F., & Tabashnik, B. (2001). Roles of Selection Intensity, Major Genes, and Minor Genes in Evolution of Insecticide Resistance. *Journal of economic entomology*, 93, 1580-1587. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.6.1580>
- Guedes, R. N. C., & Cutler, G. C. (2014). Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Management Science*, 70(5), 690-697. <https://doi.org/10.1002/ps.3669>
- Guennelon, G., Audemard, H., Fremond, J.-C., & El Idrissi Ammari, M. A. (1981a). Progrès réalisés dans l'élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie*, 1(1), 59-64. <https://doi.org/10.1051/agro:19810108>
- Guennelon, G., Audemard, H., Fremond, J.-C., & El Idrissi Ammari, M. A. (1981b). Progrès réalisés dans l'élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie*, 1(1), 59-64. <https://doi.org/10.1051/agro:19810108>
- Gui, F., Lan, T., Zhao, Y., Guo, W., Dong, Y., Fang, D., Liu, H., Li, H., Wang, H., Hao, R., Cheng, X., Li, Y., Yang, P., Sahu, S. K., Chen, Y., Cheng, L., He, S., Liu, P., Fan, G., ... Kang, L. (2022). Genomic and transcriptomic analysis unveils population evolution and development of pesticide resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Protein & Cell*, 13(7), 513-531. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00795-7>

- Hawkins, N. J., Bass, C., Dixon, A., & Neve, P. (2019). The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews*, *94*(1), 135-155. <https://doi.org/10.1111/brv.12440>
- He, W., You, M., Vasseur, L., Yang, G., Xie, M., Cui, K., Bai, J., Liu, C., Li, X., Xu, X., & Huang, S. (2012). Developmental and insecticide-resistant insights from the de novo assembled transcriptome of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Genomics*, *99*(3), 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.12.009>
- Heckel, D. G. (2012). Learning the ABCs of Bt: ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *104*(2), 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.007>
- Hedrick, P. W. (2013). Adaptive introgression in animals: Examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Molecular Ecology*, *22*(18), 4606-4618. <https://doi.org/10.1111/mec.12415>
- Heidel-Fischer, H. M., & Vogel, H. (2015). Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. *Current Opinion in Insect Science*, *8*, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.004>
- Higgins, C. F. (1992). ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annual Review of Cell Biology*, *8*(1), 67-113. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435>
- Hubbard, C. B., & Gerry, A. C. (2021). Genetic evaluation and characterization of behavioral resistance to imidacloprid in the house fly. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *171*, 104741. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104741>
- Humann, J. L., Lee, T., Ficklin, S., & Main, D. (2019). Structural and Functional Annotation of Eukaryotic Genomes with GenSAS. In M. Kollmar (Éd.), *Gene Prediction: Methods and Protocols* (p. 29-51). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_3)

- Ibrahim, S. A., & Ottea, J. A. (1995). Biochemical and Toxicological Studies with Laboratory and Field Populations of *Heliothis virescens* (F.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 53(2), 116-128. <https://doi.org/10.1006/pest.1995.1059>
- Ingham, V. A., Tennessen, J. A., Lucas, E. R., Elg, S., Yates, H. C., Carson, J., Guelbeogo, W. M., Sagnon, N., Hughes, G. L., Heinz, E., Neafsey, D. E., & Ranson, H. (2021a). Integration of whole genome sequencing and transcriptomics reveals a complex picture of the reestablishment of insecticide resistance in the major malaria vector *Anopheles coluzzii*. *PLOS Genetics*, 17(12), e1009970. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009970>
- Ingham, V. A., Tennessen, J. A., Lucas, E. R., Elg, S., Yates, H. C., Carson, J., Guelbeogo, W. M., Sagnon, N., Hughes, G. L., Heinz, E., Neafsey, D. E., & Ranson, H. (2021b). Integration of whole genome sequencing and transcriptomics reveals a complex picture of the reestablishment of insecticide resistance in the major malaria vector *Anopheles coluzzii*. *PLOS Genetics*, 17(12), e1009970. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009970>
- James, R. R., & Xu, J. (2012). Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(2), 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.12.005>
- Jeffreys, H. (1961). *The Theory of Probability*. OUP Oxford.
- Joußen, N., Heckel, D. G., Haas, M., Schuphan, I., & Schmidt, B. (2008). Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 CYP6G1 expressed in cell cultures of *Nicotiana tabacum* suggests detoxification of these insecticides in Cyp6g1-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance. *Pest Management Science*, 64(1), 65-73. <https://doi.org/10.1002/ps.1472>

- Ju, D., Mota-Sanchez, D., Fuentes-Contreras, E., Zhang, Y.-L., Wang, X.-Q., & Yang, X.-Q. (2021). Insecticide resistance in the *Cydia pomonella* (L): Global status, mechanisms, and research directions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 178, 104925. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104925>
- Kanga, L. H. B., Pree, D. J., van Lier, J. L., & Whitty, K. J. (1997). Mechanisms of Resistance to Organophosphorus and Carbamate Insecticides in Oriental Fruit Moth Populations (*Grapholita Molesta* Busck). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 59(1), 11-23. <https://doi.org/10.1006/pest.1997.2304>
- Karoly, E. D., Rose, R. L., Thompson, D. M., Hodgson, E., Rock, G. C., & Roe, R. M. (1996). Monooxygenase, Esterase, and Glutathione Transferase Activity Associated with Azinphosmethyl Resistance in the Tufted Apple Bud Moth, *Platynota idaeusalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 55(2), 109-121. <https://doi.org/10.1006/pest.1996.0040>
- Katsuhira, T., Furuya, T., Gotoh, M., Tohnishi, M., Takaishi, H., Sakata, K., Morimoto, M., & Seo, A. (2006). *Heterocyclic dicarboxylic acid diamide derivatives, agricultural/horticultural insecticides and method of using the same* (European Union Brevet EP1188745B1). <https://patents.google.com/patent/EP1188745B1/fr?q=EP+1188745>
- Kawecki, T. J., Lenski, R. E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., & Whitlock, M. C. (2012). Experimental evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(10), 547-560. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.06.001>
- Kliot, A., & Ghanim, M. (2012). Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science*, 68(11), 1431-1437. <https://doi.org/10.1002/ps.3395>



- Knight, A. L. (2007). *Multiple Mating of Male and Female Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Apple Orchards Treated with Sex Pheromone*.  
<https://academic.oup.com/ee/article/36/1/157/496071>
- Koboldt, D. C., Chen, K., Wylie, T., Larson, D. E., McLellan, M. D., Mardis, E. R., Weinstock, G. M., Wilson, R. K., & Ding, L. (2009). VarScan: Variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics*, 25(17), 2283-2285.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp373>
- Koboldt, D. C., Zhang, Q., Larson, D. E., Shen, D., McLellan, M. D., Lin, L., Miller, C. A., Mardis, E. R., Ding, L., & Wilson, R. K. (2012a). VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research*, 22(3), 568-576. <https://doi.org/10.1101/gr.129684.111>
- Koboldt, D. C., Zhang, Q., Larson, D. E., Shen, D., McLellan, M. D., Lin, L., Miller, C. A., Mardis, E. R., Ding, L., & Wilson, R. K. (2012b). VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research*, 22(3), 568-576. <https://doi.org/10.1101/gr.129684.111>
- Kofler, R., Pandey, R. V., & Schlotterer, C. (2011). PoPoolation2: Identifying differentiation between populations using sequencing of pooled DNA samples (Pool-Seq). *Bioinformatics*, 27(24), 3435-3436. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr589>
- Kofler, R., & Schlötterer, C. (2014). A Guide for the Design of Evolve and Resequencing Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 31(2), 474-483.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst221>
- Krueger, F., James, F., Ewels, P., Afyounian, E., Weinstein, M., Schuster-Boeckler, B., Hulselmans, G., & Sclavons. (2015). *TrimGalore* (0.6.5) [Logiciel]. Zenodo.  
<https://doi.org/10.5281/ZENODO.5127898>

- Lalouette, L., Pottier, M.-A., Wycke, M.-A., Boitard, C., Bozzolan, F., Maria, A., Demondion, E., Chertemps, T., Lucas, P., Renault, D., Maibeche, M., & Siauxsat, D. (2016). Unexpected effects of sublethal doses of insecticide on the peripheral olfactory response and sexual behavior in a pest insect. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(4), 3073-3085. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5923-3>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078-2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007a). Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, *52*(1), 231-253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- Li, X., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007b). Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, *52*(1), 231-253. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- Li, X., Zhu, B., Gao, X., & Liang, P. (2017). Over-expression of UDP-glycosyltransferase gene UGT2B17 is involved in chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Management Science*, *73*(7), 1402-1409. <https://doi.org/10.1002/ps.4469>
- Long, A., Liti, G., Luptak, A., & Tenaillon, O. (2015). Elucidating the molecular architecture of adaptation via evolve and resequence experiments. *Nature reviews. Genetics*, *16*(10), 567-582. <https://doi.org/10.1038/nrg3937>
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). Chapter Two—The Evolution of Fungicide Resistance. In S. Sariaslani & G. M. Gadd (Éds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 90, p. 29-92). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>

- Malhat, F., Abdallah, H., & Hegazy, I. (2012). Dissipation of Chlorantraniliprole in Tomato Fruits and Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(3), 349-351. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0465-y>
- Mallott, M., Hamm, S., Troczka, B. J., Randall, E., Pym, A., Grant, C., Baxter, S., Vogel, H., Shelton, A. M., Field, L. M., Williamson, M. S., Paine, M., Zimmer, C. T., Slater, R., Elias, J., & Bass, C. (2019). A flavin-dependent monooxygenase confers resistance to chlorantraniliprole in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 115, 103247. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.103247>
- Mani, E., & Wildbolz, Th. (1977). The dispersal of male codling moths (*Laspeyresia pomonella* L.) in the Upper Rhine Valley. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 83(1-4), 161-168. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1977.tb02386.x>
- Matsumura, F. (2010). Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(2), 133-139. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.10.001>
- Melander, A. L. (1914). Can insects become resistant to sprays? *Journal of Economic Entomology*, 7(2), 167-173.
- Messer, P. W., & Petrov, D. A. (2013). Population genomics of rapid adaptation by soft selective sweeps. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(11), 659-669. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.08.003>
- Nauen, R., Stumpf, N., & Elbert, A. (2002). Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Management Science*, 58(9), 868-875. <https://doi.org/10.1002/ps.557>

Nelson, D. R., Goldstone, J. V., & Stegeman, J. J. (2013). The cytochrome P450 genesis locus:

The origin and evolution of animal cytochrome P450s. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612), 20120474.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0474>

Nikou, D., Ranson, H., & Hemingway, J. (2003). An adult-specific CYP6 P450 gene is

overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene*, 318, 91-102. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00763-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00763-7)

Oakeshott, J. G., Claudianos, C., Campbell, P. M., Newcomb, R. D., & Russell, R. J. (2005).

Biochemical Genetics and Genomics of Insect Esterases. In *Comprehensive Molecular Insect Science* (p. 309-381). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00073-9>

Oakeshott, J. G., Home, I., Sutherland, T. D., & Russell, R. J. (2003). The genomics of insecticide

resistance. *Genome Biology*, 4(1), 202. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-1-202>

OMS. (1992). *Résistance des vecteurs aux pesticides* (Rapport technique 818; Rapports du

Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle). OMS.

[https://archive.wikiwix.com/cache/index2.php?url=http%3A%2F%2Fwhqlibdoc.who.int%2Ftrs%2FWHO\\_TRS\\_818\\_fre.pdf%2Findex.html#federation=archive.wikiwix.com&tab=url](https://archive.wikiwix.com/cache/index2.php?url=http%3A%2F%2Fwhqlibdoc.who.int%2Ftrs%2FWHO_TRS_818_fre.pdf%2Findex.html#federation=archive.wikiwix.com&tab=url)

Palumbi, S. R. (2001a). Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. *Science*, 293(5536),

1786-1790. <https://doi.org/10.1126/science.293.5536.1786>

Palumbi, S. R. (2001b). Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. *Science*,

293(5536), 1786-1790. <https://doi.org/10.1126/science.293.5536.1786>

Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A., & Kingsford, C. (2017). Salmon provides fast

and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*, 14(4),

417-419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>

- Pavlidis, N., Vontas, J., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.007>
- Pélessié, B., Chen, Y. H., Cohen, Z. P., Crossley, M. S., Hawthorne, D. J., Izzo, V., & Schoville, S. D. (2021). *Genome resequencing reveals rapid, repeated evolution in the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata* [Preprint]. *Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1101/2021.02.09.430453>
- Peng, Y., Zhao, J., Sun, Y., Wan, P., Hu, Y., Luo, G., Qin, W., & Huang, S. (2021). Insights into chlorantraniliprole resistance of *Chilo suppressalis*: Expression profiles of ATP-binding cassette transporter genes in strains ranging from low- to high-level resistance. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 24(2), 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.02.006>
- Pignatelli, P., Ingham, V. A., Balabanidou, V., Vontas, J., Lycett, G., & Ranson, H. (2018). The *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter family: Phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance: *Anopheles gambiae ABC transporters*. *Insect Molecular Biology*, 27(1), 110-122. <https://doi.org/10.1111/imb.12351>
- Pons, S., Riedl, H., & Avilla, J. (1999). Toxicity of the Ecdysone Agonist Tebufenozide to Codling Moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 92(6), 1344-1351. <https://doi.org/10.1093/jee/92.6.1344>
- Qiu, Y., Tittiger, C., Wicker-Thomas, C., Le Goff, G., Young, S., Wajnberg, E., Fricaux, T., Taquet, N., Blomquist, G. J., & Feyereisen, R. (2012). An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), 14858-14863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208650109>

R Core Team. (2022). *R: The R Project for Statistical Computing*. <https://www.r-project.org/>

R4P. (2018). *Universal classification of PPPs / Classification universelle des PPP*.

<https://doi.org/10.17605/OSF.IO/UBHR5>

R4P Network. (2016a). Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection. *Trends in Plant Science*, 21(10), 834-853. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.006>

R4P Network. (2016b). Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection. *Trends in Plant Science*, 21(10), 834-853. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.006>

Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M.

F., Collins, F. H., & Feyereisen, R. (2002). Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. *Science*, 298(5591), 179-181.

<https://doi.org/10.1126/science.1076781>

Remigi, P., Masson-Boivin, C., & Rocha, E. P. C. (2019). Experimental Evolution as a Tool to Investigate Natural Processes and Molecular Functions. *Trends in Microbiology*, 27(7), 623-634. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.02.003>

Rewitz, K. F., Styrislave, B., Løbner-Olesen, A., & Andersen, O. (2006). Marine invertebrate cytochrome P450: Emerging insights from vertebrate and insect analogies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(4), 363-381. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.04.001>

Reyes, M., Franck, P., Charmillot, P.-J., Ioriatti, C., Olivares, J., Pasqualini, E., & Sauphanor, B. (2007a). Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, 63(9), 890-902. <https://doi.org/10.1002/ps.1421>

Reyes, M., Franck, P., Charmillot, P.-J., Ioriatti, C., Olivares, J., Pasqualini, E., & Sauphanor, B. (2007b). Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European

populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, 63(9), 890-902. <https://doi.org/10.1002/ps.1421>

Reyes, M., Franck, P., Olivares, J., Margaritopoulos, J., Knight, A., & Sauphanor, B. (2009a). Worldwide variability of insecticide resistance mechanisms in the codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 99(4), 359-369. <https://doi.org/10.1017/S0007485308006366>

Reyes, M., Franck, P., Olivares, J., Margaritopoulos, J., Knight, A., & Sauphanor, B. (2009b). Worldwide variability of insecticide resistance mechanisms in the codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, 99(4), 359-369. <https://doi.org/10.1017/S0007485308006366>

Reyes, M., & Sauphanor, B. (2008a). Resistance monitoring in codling moth: A need for standardization. *Pest Management Science*, 64(9), 945-953. <https://doi.org/10.1002/ps.1588>

Reyes, M., & Sauphanor, B. (2008b). Resistance monitoring in codling moth: A need for standardization. *Pest Management Science*, 64(9), 945-953. <https://doi.org/10.1002/ps.1588>

Ritz, C. (2020a). *Dose-response analysis using R*. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Ritz, C. (2020b). *Dose-response analysis using R*. CRC Press, Taylor & Francis Group.

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010a). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010b). EdgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>

- Rodríguez, M. A., Bosch, D., Sauphanor, B., & Avilla, J. (2010). Susceptibility to Organophosphate Insecticides and Activity of Detoxifying Enzymes in Spanish Populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 103(2), 482-491. <https://doi.org/10.1603/EC09249>
- Rostant, W. G., Wedell, N., & Hosken, D. J. (2012). Chapter 2—Transposable Elements and Insecticide Resistance. In S. F. Goodwin, T. Friedmann, & J. C. Dunlap (Éds.), *Advances in Genetics* (Vol. 78, p. 169-201). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394394-1.00002-X>
- Roush, R. T., & Daly, J. C. (1990a). The Role of Population Genetics in Resistance Research and Management. In R. T. Roush & B. E. Tabashnik (Éds.), *Pesticide Resistance in Arthropods* (p. 97-152). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0_5)
- Roush, R. T., & Daly, J. C. (1990b). The Role of Population Genetics in Resistance Research and Management. In R. T. Roush & B. E. Tabashnik (Éds.), *Pesticide Resistance in Arthropods* (p. 97-152). Springer US. [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4684-6429-0\\_5](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4684-6429-0_5)
- Roush, R. T., & McKenzie, J. A. (1987). Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. *Annual Review of Entomology*, 32(1), 361-380. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.002045>
- Roush, R. T., & Tabashnik, B. E. (Éds.). (1990). *Pesticide Resistance in Arthropods*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0>
- Russell, R. J., Scott, C., Jackson, C. J., Pandey, R., Pandey, G., Taylor, M. C., Coppin, C. W., Liu, J.-W., & Oakeshott, J. G. (2011). The evolution of new enzyme function: Lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evolutionary Applications*, 4(2), 225-248. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00175.x>



- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24, 104-108.
- Schlötterer, C., Kofler, R., Versace, E., Tobler, R., & Franssen, S. U. (2015). Combining experimental evolution with next-generation sequencing: A powerful tool to study adaptation from standing genetic variation. *Heredity*, 114(5), 431-440.  
<https://doi.org/10.1038/hdy.2014.86>
- Scott, J. G. (2017). Evolution of resistance to pyrethroid insecticides in *Musca domestica*. *Pest Management Science*, 73(4), 716-722. <https://doi.org/10.1002/ps.4328>
- Seong, K. M., Sun, W., Clark, J. M., & Pittendrigh, B. R. (2016). Splice form variant and amino acid changes in MDR49 confers DDT resistance in transgenic *Drosophila*. *Scientific Reports*, 6(1), 23355. <https://doi.org/10.1038/srep23355>
- Shan, J., Sun, X., Li, R., Zhu, B., Liang, P., & Gao, X. (2021). Identification of ABCG transporter genes associated with chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Management Science*, 77(7), 3491-3499. <https://doi.org/10.1002/ps.6402>
- Siegfried, B. D., Swanson, J. J., & Devonshire, A. L. (1997). Immunological Detection of Greenbug (*Schizaphis graminum*) Esterases Associated with Resistance to Organophosphate Insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 57(3), 165-170.  
<https://doi.org/10.1006/pest.1997.2274>
- Siegwart, M. (2021). *Combinaison, caractéristiques et origine de mécanismes de résistance aux (bio)insecticides chez des insectes ravageurs des cultures.*
- Siegwart, M., & Maugin, S. (2013). *Résistance du carpocapse des pommes et des poires (Cydia pomonella) au virus de la granulose—Plan de surveillance 2013.*

- Simmons, J., D'Souza, O., Rheault, M., & Donly, C. (2013). Multidrug resistance protein gene expression in *Trichoplusia ni* caterpillars. *Insect Molecular Biology*, 22(1), 62-71.  
<https://doi.org/10.1111/imb.12003>
- Soderlund, D. M. (2008). Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science*, 64(6), 610-616. <https://doi.org/10.1002/ps.1574>
- Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1990). Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. In R. T. Roush & B. E. Tabashnik (Éds.), *Pesticide Resistance in Arthropods* (p. 58-96). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0_4)
- Soleño, J., Parra-Morales, L. B., Cichón, L., Garrido, S., Guiñazú, N., & Montagna, C. M. (2020). Occurrence of pyrethroid resistance mutation in *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) throughout Argentina. *Bulletin of Entomological Research*, 110(2), 201-206.  
<https://doi.org/10.1017/S0007485319000439>
- Somers, J., Luong, H. N. B., Batterham, P., & Perry, T. (2018). Deletion of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene D $\alpha$ 1 confers insecticide resistance, but at what cost? *Fly*, 12(1), 46-54. <https://doi.org/10.1080/19336934.2017.1396399>
- Song, Y., Endepols, S., Klemann, N., Richter, D., Matuschka, F.-R., Shih, C.-H., Nachman, M. W., & Kohn, M. H. (2011). Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice. *Current Biology: CB*, 21(15), 1296-1301. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.043>
- Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015). IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 121, 122-128.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Stoeckli, S., Hirschi, M., Spirig, C., Calanca, P., Rotach, M. W., & Samietz, J. (2012). Impact of Climate Change on Voltinism and Prospective Diapause Induction of a Global Pest

Insect – *Cydia pomonella* (L.). *PLOS ONE*, 7(4), e35723.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035723>

Stone, C. M., Jackson, B. T., & Foster, W. A. (2012). Effects of bed net use, female size, and plant abundance on the first meal choice (blood vs sugar) of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, 11(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-3>

Tabashnik, B. E. (1990). Modeling and Evaluation of Resistance Management Tactics. In R. T. Roush & B. E. Tabashnik (Éds.), *Pesticide Resistance in Arthropods* (p. 153-182). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0_6)

Tabata, J., Noguchi, H., Kainoh, Y., Mochizuki, F., & Sugie, H. (2007). Behavioral response to sex pheromone-component blends in the mating disruption-resistant strain of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* Yasuda (Lepidoptera: Tortricidae), and its mode of inheritance. *Applied Entomology and Zoology*, 42(4), 675-683. <https://doi.org/10.1303/aez.2007.675>

Thaler, R., Brandstätter, A., Meraner, A., Chabicovski, M., Parson, W., Zelger, R., Dalla Via, J., & Dallinger, R. (2008). Molecular phylogeny and population structure of the codling moth (*Cydia pomonella*) in Central Europe: II. AFLP analysis reflects human-aided local adaptation of a global pest species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3), 838-849. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.05.027>

Tohnishi, M., Nakao, H., Furuya, T., Seo, A., Kodama, H., Tsubata, K., Fujioka, S., Kodama, H., Hirooka, T., & Nishimatsu, T. (2005). Flubendiamide, a Novel Insecticide Highly Active against Lepidopterous Insect Pests. *Journal of Pesticide Science*, 30(4), 354-360. <https://doi.org/10.1584/jpestics.30.354>

Ullrich, V., & Weber, P. (1972). *The O-Dealkylation of 7-Ethoxycoumarin by Liver Microsomes. A Direct Fluorometric Test*. 353(2), 1171-1177.

<https://doi.org/10.1515/bchm2.1972.353.2.1171>

Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Mavridis, K., & Vontas, J. (2020). Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 69-76.

<https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.03.006>

Voudouris, C. Ch., Sauphanor, B., Franck, P., Reyes, M., Mamuris, Z., Tsitsipis, J. A., Vontas, J., & Margaritopoulos, J. T. (2011). Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3), 229-238.

<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.04.006>

Walsh, S. B., Dolden, T. A., Moores, G. D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A. L., & Williamson, M. S. (2001). Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochemical Journal*, 359(Pt 1), 175-181.

Wan, F., Yin, C., Tang, R., Chen, M., Wu, Q., Huang, C., Qian, W., Rota-Stabelli, O., Yang, N., Wang, S., Wang, G., Zhang, G., Guo, J., Gu, L. (Aloy), Chen, L., Xing, L., Xi, Y., Liu, F., Lin, K., ... Li, F. (2019a). A chromosome-level genome assembly of *Cydia pomonella* provides insights into chemical ecology and insecticide resistance. *Nature Communications*, 10(1), Article 1.

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12175-9>

Wan, F., Yin, C., Tang, R., Chen, M., Wu, Q., Huang, C., Qian, W., Rota-Stabelli, O., Yang, N., Wang, S., Wang, G., Zhang, G., Guo, J., Gu, L. (Aloy), Chen, L., Xing, L., Xi, Y., Liu, F., Lin, K., ... Li, F. (2019b). A chromosome-level genome assembly of *Cydia pomonella*

- provides insights into chemical ecology and insecticide resistance. *Nature Communications*, 10(1), 4237. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12175-9>
- Weetman, D., Wilding, C. S., Neafsey, D. E., Müller, P., Ochomo, E., Isaacs, A. T., Steen, K., Rippon, E. J., Morgan, J. C., Maweje, H. D., Rigden, D. J., Okedi, L. M., & Donnelly, M. J. (2018). Candidate-gene based GWAS identifies reproducible DNA markers for metabolic pyrethroid resistance from standing genetic variation in East African *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21265-5>
- Weissling, T. J., & Knight, A. L. (1995). Vertical distribution of codling moth adults in pheromone-treated and untreated plots. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 77(3), 271-275. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1995.tb02324.x>
- Wilkinson, C. F. (1983). Role of Mixed-Function Oxidases in Insecticide Resistance. In G. P. Georghiou & T. Saito (Éds.), *Pest Resistance to Pesticides* (p. 175-205). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4466-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4466-7_7)
- Xu, L., Mei, Y., Liu, R., Chen, X., Li, D., & Wang, C. (2020). Transcriptome analysis of *Spodoptera litura* reveals the molecular mechanism to pyrethroids resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 169, 104649. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104649>
- Zalucki, M., & Furlong, M. (2017). Behavior as a mechanism of insecticide resistance: Evaluation of the evidence. *Current Opinion in Insect Science*, 21, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.006>
- Zhang, L., Khan, S. U., Akhtar, M. H., & Iverson, K. C. (1984). Persistence, degradation, and distribution of deltamethrin in an organic soil under laboratory conditions. *Journal of*

*Agricultural and Food Chemistry*, 32(6), 1207-1211.

<https://doi.org/10.1021/jf00126a001>

Zhou, X., Scharf, M. E., Meinke, L. J., Chandler, L. D., & Siegfried, B. D. (2005). Immunological assessment of an insecticide resistance-associated esterase in the Western corn rootworm. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 58(3), 157-165.

<https://doi.org/10.1002/arch.20040>

Zhu, F., Sams, S., Moural, T., Haynes, K. F., Potter, M. F., & Palli, S. R. (2012). RNA Interference of NADPH-Cytochrome P450 Reductase Results in Reduced Insecticide Resistance in the Bed Bug, *Cimex lectularius*. *PLoS ONE*, 7(2), e31037.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031037>

Zhu, J.-Y., Li, L., Xiao, K.-R., He, S.-Q., & Gui, F.-R. (2021). Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Cuticular Protein Genes Responding to Different Insecticides in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insects*, 12(11), 997.

<https://doi.org/10.3390/insects12110997>

Zimmer, C. T., Garrood, W. T., Singh, K. S., Randall, E., Lueke, B., Gutbrod, O., Matthiesen, S., Kohler, M., Nauen, R., Davies, T. G. E., & Bass, C. (2018). Neofunctionalization of Duplicated P450 Genes Drives the Evolution of Insecticide Resistance in the Brown Planthopper. *Current Biology*, 28(2), 268-274.e5.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.060>

## Tables and figures

**Table 1:** Number of polymorphisms and their associated impact in our transcriptomic data from F9-10 individuals.

**Figure 1:** Experimental evolution design. Colours indicate insecticide lines and dashed lines indicate sub-lines exposed to gradient of insecticide doses with corresponding lethal doses (LD) indicated.

**Figure 2:** Expression profiles of annotated genes associated with resistance in our insecticide-selected lines (CHL: chlorantraniliprole-selected, DEL: deltamethrin-selected, SPI: spinosad-selected). All genes differentially transcribed in at least one selected sub-line are shown. Colour scale shows the mean Log<sub>2</sub> fold change between each selected sub-line and its control sub-line. Stars indicate a significant differential transcription ( $|\log_2FC| > 1.5$  and  $FDR < 0.05$ ). Genes marked with an orange square indicate their belonging to our database of candidate genes, genes indicated with an asterisk have had their annotation retrieved from the *nr* NCBI database.

**a)** Between F9-10 control and medium LD (MD) sub-lines.

**b)** Between F9-10 control and high LD (HD) sub-lines.

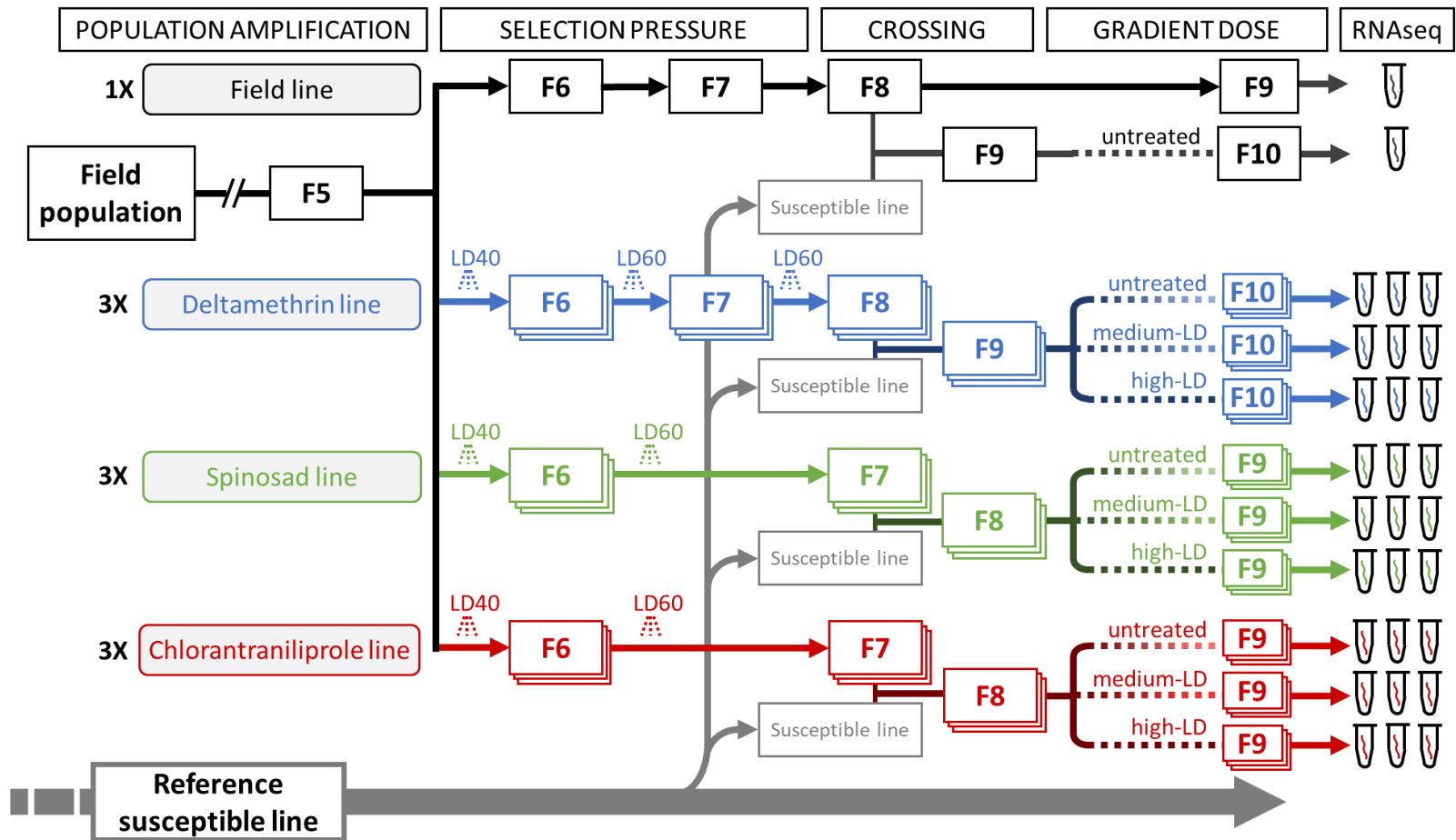
**c)** Overview of the differentially expressed genes in common between the different insecticide-selected sub-lines

**Table 1:**

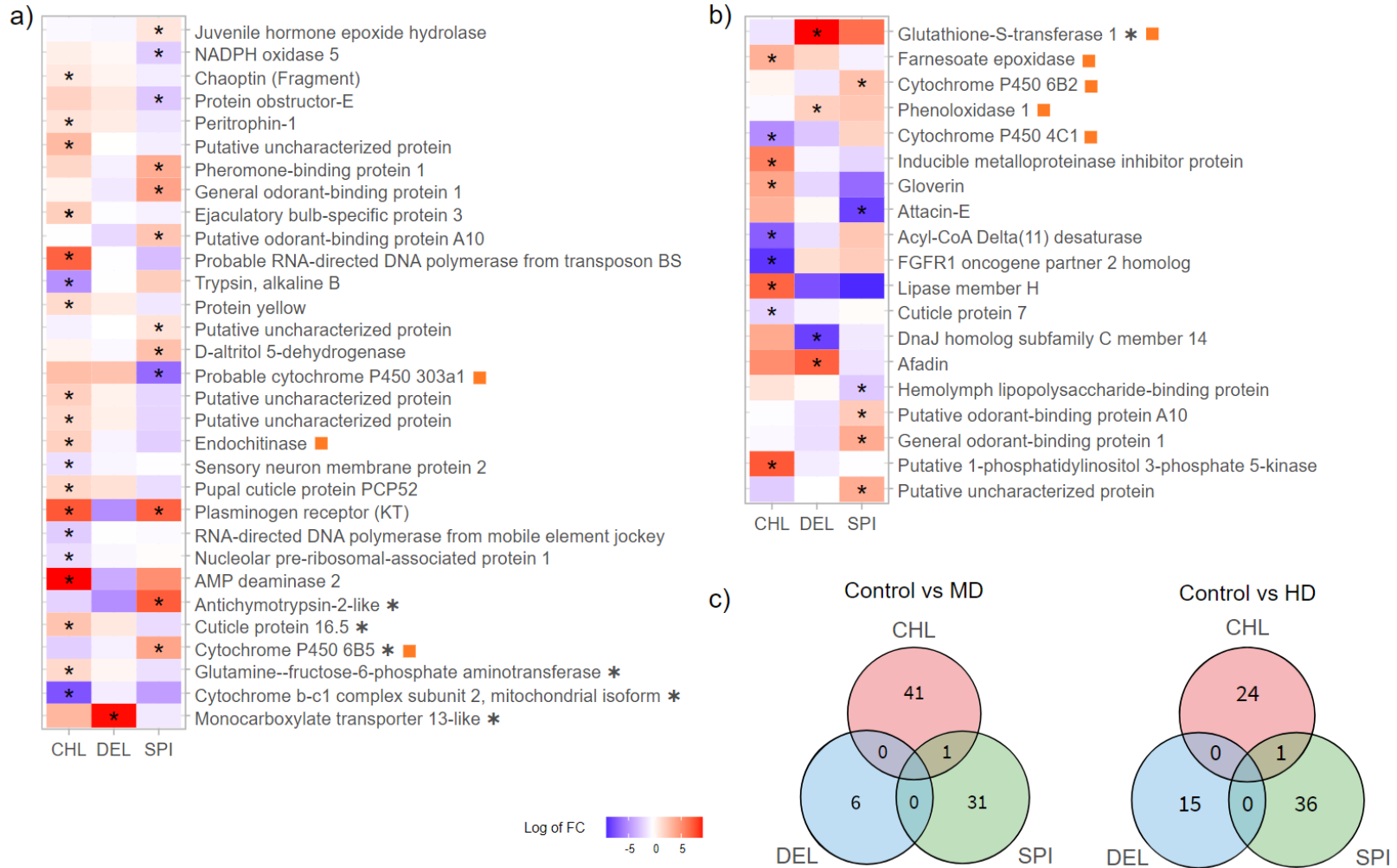
	Chlorantraniliprole lines	Deltamethrin lines	Spinosad lines
Total number of polymorphisms	82,172	96,144	87,463
Number of polymorphisms passing filter	208 (0.25%)	156 (0.16%)	228 (0.26%)
Number of genes affected	60 (4 candidate genes)	38 (4 candidate genes)	31 (5 candidate genes)
Synonymous variants	48 (23%)	29 (19%)	20 (9%)
Non-synonymous variants	10 (5%)	5 (3%)	12 (5%)
Upstream variants	16 (8%)	16 (10%)	14 (6%)
Downstream variants	79 (38%)	68 (44%)	121 (53%)
Variants in unreferenced transcripts	55 (26%)	38 (24%)	61 (27%)



Figure 1:



**Figure 2:**



**Supplementary Information**

**Table S1.** Bioassay data from the 2017 resistance monitoring of the Cavaillon population.

Insecticide	Population	Diagnostic dose (DD)	Control	Number dead in control	Number tested at DD	Number dead at DD	Corrected mortality (%)	KHI2 /SS Corr. Yates	Signif.
Phosmet	Susc.	30.3	99	12	24	22	90.52	0.00	-
	Cavaillon pop.	30.3	54	12	26	9	15.93	168.14	***
Thiacloprid	Susc.	27.88	99	12	24	23	95.26	0.00	-
	Cavaillon pop	27.88	54	12	23	10	27.33	221.74	***
CpGVM	Susc.	6250	99	12	23	22	95.05	0.00	-
	Cavaillon pop.	6250	54	12	29	13	29.06	265.43	***
Chlorantraniliprole	Susc.	3	99	12	24	23	95.26	0.00	-
	Cavaillon pop.	3	54	12	26	13	35.71	192.39	***
Deltamethrin	Susc.	0.95	37	3	24	23	95.47	0.00	-
	Cavaillon pop.	0.95	55	9	22	10	34.78	184.21	***

**Table S2.** Number of adult individuals from each generation that were used to build the next generation of the experimental evolution.

Insecticide	Generation	LD	Replicate	Number of individuals
CHL	G0			1700
	G1			972
	G2			1025
	G3			547
	G4			596
	G5			2590
	G6	40		1129
	G7	60	R1	118
			R2	76
			R3	65
	G8	0	R1	776
			R2	585
			R3	634
	G9	0	R1	178
			R2	183
R3			184	
G9	25	R1	273	
		R2	255	
		R3	269	
G9	75	R1	312	
		R2	239	
		R3	261	
G6	40	NA	1745	
G7	60	R1	307	
		R2	340	
		R3	265	
G8	0	R1	121	
		R2	88	
		R3	78	
G9	0	R1	744	
		R2	567	
		R3	445	
G10	0	R1	187	
		R2	196	
		R3	149	
G10	25	R1	318	
		R2	285	
		R3	250	
G10	75	R1	59	
		R2	61	
		R3	65	
G6	40	NA	1498	
G7	60	R1	121	
		R2	88	
		R3	78	
G8	0	R1	744	
		R2	567	
		R3	445	
G9	0	R1	272	
		R2	231	
		R3	120	
G9	25	R1	181	
		R2	147	
		R3	173	
G9	75	R1	314	
		R2	179	
		R3	186	

**Table S3.** Concentration (in ppm) of active substances used during the experimental evolution and for the bioassays

Insecticide	Experimental evolution				Bioassays				Diagnostic doses	
	F6	F7	F9-10		0.3	0.53	0.95	1.96		
	(LD40)	(LD60)	(Medium LD)	(High LD)						
Chlorantraniliprole	0.3	0.83	0.37	0.9	0.3	0.53	0.95	1.96	3	1.03
Deltamethrin	0.003	0.036	0.049	0.152	0	0.01	0.03	0.3	0.95	0.0095
Spinosad	3.2	0.73	7.8	12	0.45	1.34	4.01	12	35.9	17.41

**Table S4.** Bioassays of 3 insecticides to the susceptible reference strain (Susc.), and the different lines used during and resulting from the experimental evolution (F0: initial generation, F9: the three sub-lines in each line in the ninth generation, F10: the three sub-lines in the tenth generation), with probit regression parameters and resistance ratios. Significant differences with the susceptible reference strain are indicated (ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ ).

Insecticide-selected line	Strain	n	Slope	$\pm$ SE	LD50	95% CI	RR50
Chlorantraniliprole	Susc.	1006	1.023	0.125	0.687	(0.560-0.813)	
	F0	106	0.987	0.132	0.733	(0.524-0.829)	1.07
	F9 – Control	1046	1.163	0.085	0.517 ns	(0.464-0.571)	0.753
	F9 – Medium LD	1051	1.323	0.137	0.823 ns	(0.702-0.944)	1.19
	F9 – High LD	1429	1.262	0.122	0.750 ns	(0.639-0.860)	1.09
Deltamethrin	Susc.	957	0.793	0.098	0.083	(0.056-0.111)	
	F0	157	0.471	0.063	1.08 ***	(0.525-2.06)	13.07
	F10 – Control	1148	0.484	0.058	0.064 ns	(0.039-0.089)	0.771
	F10 – Medium LD	1237	0.768	0.113	0.111 ns	(0.075-0.148)	1.34
	F10 – High LD	517	0.627	0.107	0.193 ns	(0.101-0.284)	2.33
Spinosad	Susc.	1159	0.447	0.045	2.83	(1.87-3.79)	
	F0	116	1.256	0.283	4.71 *	(2.97-6.44)	1.66
	F9 – Control	862	0.885	0.188	5.65 ns	(3.53-7.77)	1.99
	F9 – Medium LD	1007	1.162	0.12	7.52 ***	(6.23-8.81)	2.65
	F9 – High LD	1004	1.008	0.145	7.35 **	(5.68-9.02)	2.59

**Table S5.** RNA sequencing and mapping statistics (in  $\times 10^6$  number of reads) of the nine F9 or F10 sub-lines and the unselected strain (T-SV) resulting from the experimental evolution. Each replicate consisted of pools of 5 individuals from each sub-line.

Insecticide-selected lines	Replicates	Spinosad Reads ( $\times 10^6$ )						Chlorantraniliprole Reads ( $\times 10^6$ )						Deltamethrin Reads ( $\times 10^6$ )						T-SV Reads ( $\times 10^6$ )	
		Control	%	MD	%	HD	%	Control	%	MD	%	HD	%	Control	%	MD	%	HD	%		%
Sequenced	Total	123.4	100	123.6	100	122	100	128	100	129.6	100	130.8	100	131.8	100	131.4	100	131.6	100	42.5	100
	Rep 1	40.6		42.2		40.8		42.6		42.6		45.8		43.6		41.8		45.2			
	Rep 2	42		40.8		41		42.6		43.4		42.4		43.6		45.4		44.8			
	Rep 3	40.8		40.6		40.2		42.8		43.6		42.6		44.6		44.2		41.6			
	Mean per replicate	41.1		41.2		40.47		42.7		43.2		43.6		43.9		43.8		43.9			
Quality threshold	Total	122.8	99.5	123	99.5	121.4	99.5	122.6	95.8	125	96.5	125.8	96.2	128.2	97.3	127.8	97.3	129	98.0	39.1	92.0
	Mean per replicate	40.9		41		40.7		40.9		41.7		41.9		42.7		42.6		43			
Aligned on genome	Total	104.4	84.6	103.4	83.7	103	84.4	100.4	78.4	99.9	77.1	103.1	78.8	102.8	78.0	101	76.9	102	77.5	35.1	82.6
	Mean per replicate	34.8		34.5		34.3		33.5		33.3		34.4		34.3		33.6		34			

**Table S6.** Overview of the polymorphisms selected after filtering in common between the 3 different lines resulting from the experimental evolution.

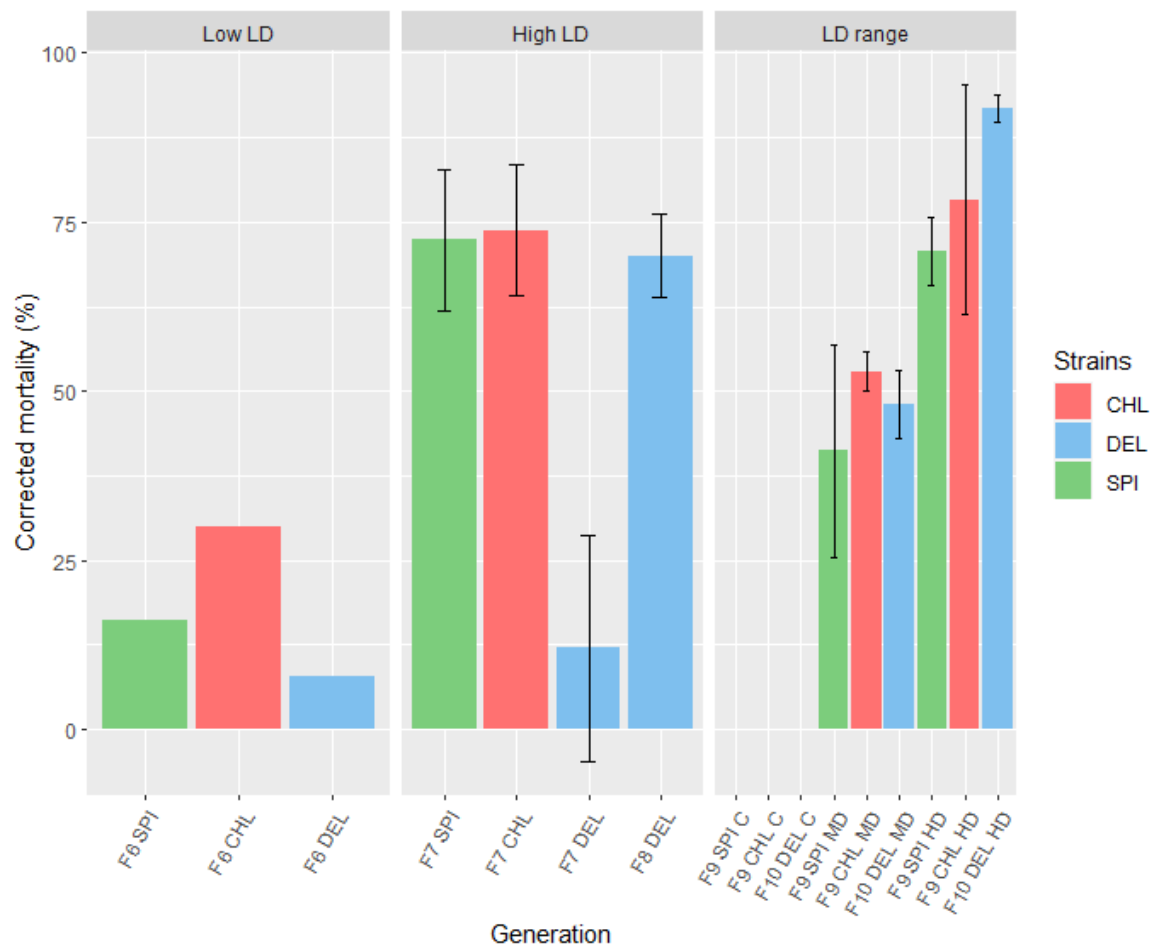
Insecticide-selected lines	Gene ID / Transcript ID	SNP Position	Annotation
Chlorantraniliprole + Spinosad	cpo051990	chr10 : 26114849	Putative uncharacterized protein
	MSTRG.23808.2	chr5 : 26600959	<i>No annotation available</i>
	MSTRG.28394.1	chr9 : 16303530	<i>No annotation available</i>
Deltamethrin + Spinosad	MSTRG.28394.1	chr9 : 16303637	<i>No annotation available</i>
	cpo059390	chr11 : 14683642	CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 4
	MSTRG.13191.1	chr2 : 36188862	<i>No annotation available</i>
	MSTRG.16786.1	chr24 : 2597483	<i>No annotation available</i>



**Table S7.** Overview of the polymorphisms selected after filtering, which were blasted to our local resistance candidate genes database, in the 3 different lines resulting from the experimental selection experiment.

Insecticide-selected lines	Gene ID	SNP Position	Annotation
Chlorantraniliprole	cpo138210	chr3 : 23592312	ATP-binding cassette sub-family G member 4
	cpo053890	chr3 : 32488208	ATP-binding cassette sub-family E member 1
	cpo066900	chr6 : 7254752	Heat shock factor-binding protein 1
	cpo087610	chr6 : 24449722	NADH dehydrogenase flavoprotein 1, mitochondrial
Deltamethrin	cpo136030	chr3 : 296508	ATP-binding cassette sub-family G member 1
	cpo136030	chr3 : 296507	ATP-binding cassette sub-family G member 1
	cpo060030	chr11 : 13126091	NADPH-cytochrome P450 reductase
	cpo098380	chr27 : 11254349	Cuticle protein 1
	cpo039980	chr20 : 2891741	Cuticle protein 7
Spinosad	cpo113930	chr3 : 20842091	Esterase B1
	cpo124940	chr13 : 25509139	Multidrug resistance protein homolog 49
	cpo057810	chr24 : 9471250	Heat shock protein 68
	cpo127980	chr28 : 11089193	NADH dehydrogenase iron-sulfur protein 2, mitochondrial
	cpo060030	chr11 : 13125892	NADPH-cytochrome P450 reductase

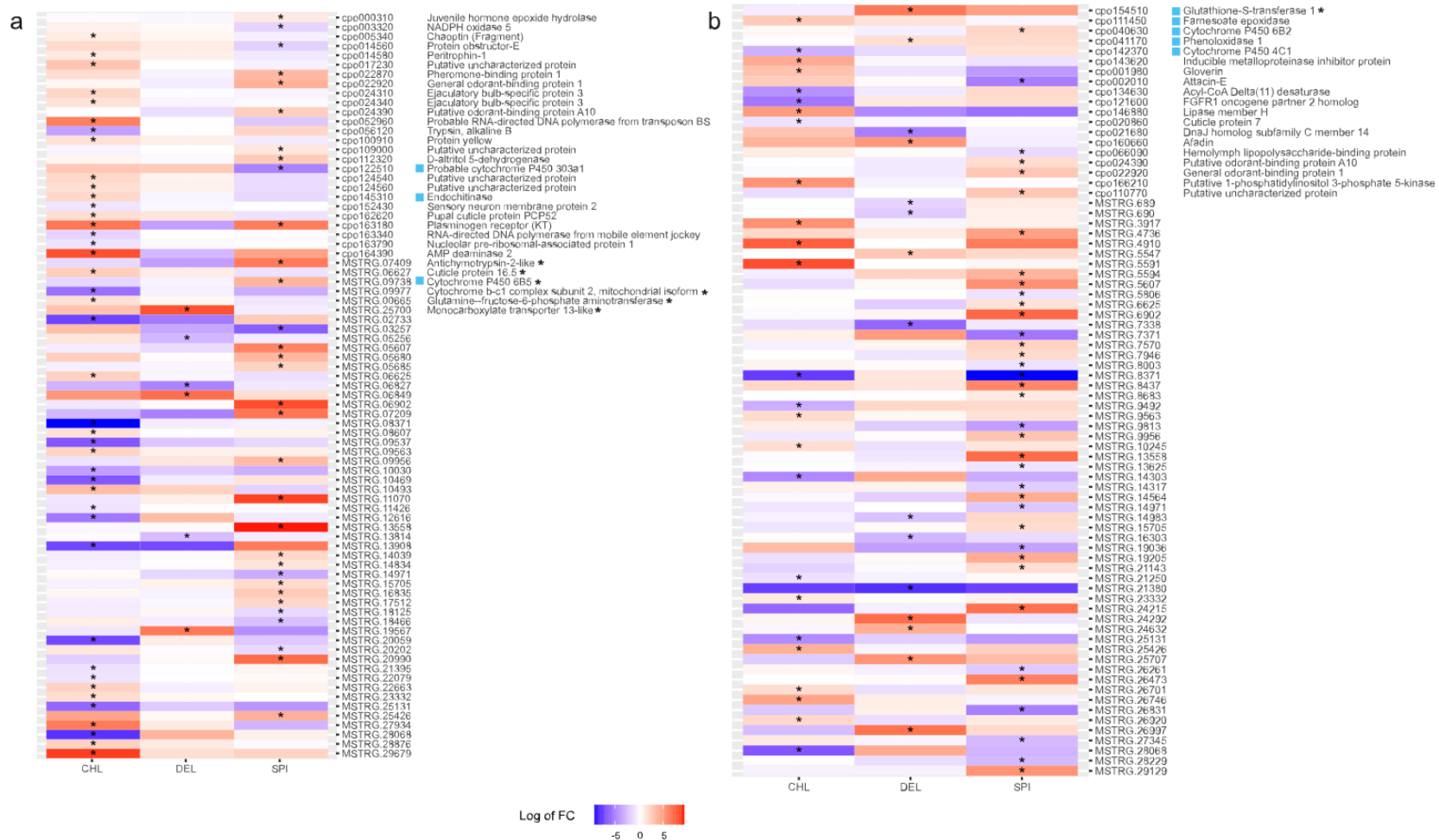
**Figure S1:** Corrected mortality (compared to the respective control line of each generation) of the different insecticide-selected lines and sub-lines during the experimental selection experiment (repetitions pooled) CHL: chlorantraniliprole line, DEL: deltamethrin line, SPI: spinosad line. For generations F7 and F9-10 confidence intervals were calculated across the 3 replicates per line. Since replicates were created by splitting surviving adults of generation F6, no confidence interval could be drawn for this generation.



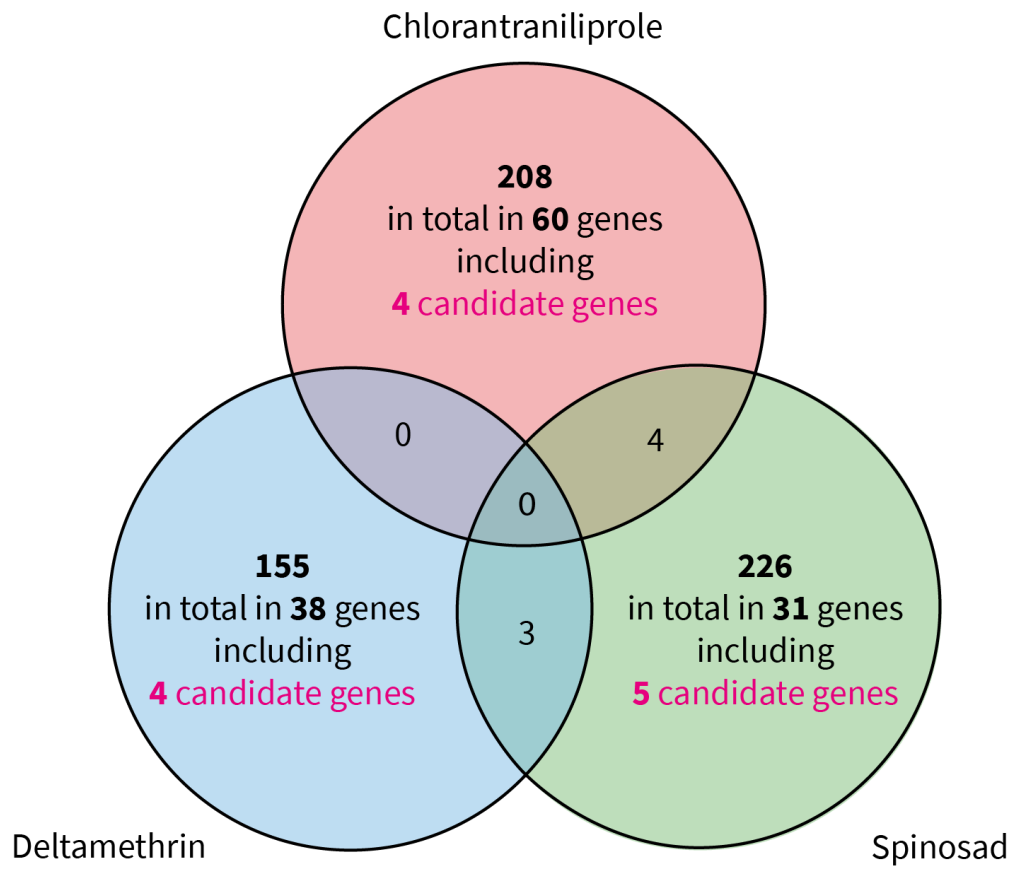
**Figure S2:** Expression profiles of all the genes associated with resistance in our insecticide-selected lines, with their annotation when available (CHL: chlorantraniliprole-selected, DEL: deltamethrin-selected, SPI: spinosad-selected). All genes differentially transcribed in at least one selected sub-line are shown. Colour scale shows the mean Log2 fold change between each selected sub-line and its control sub-line. Stars indicate a significant differential transcription ( $|\log_2FC| > 1.5$  and  $FDR < 0.05$ ). Genes marked with a blue square indicate their belonging to our database of candidate genes, genes indicated with an asterisk have had their annotation retrieved from the nr NCBI database.

**A)** between F9-10 control and medium LD (MD) sub-lines.

**B)** between F9-10 control and high LD (HD) sub-lines.



**Figure S3:** Overview of the polymorphisms selected within each insecticide-selected line. Gene numbers highlighted in pink indicate their belonging to our candidate gene database.



### **Appendix S1: Tube bioassays**

The concentrations of the different insecticide solutions applied for selection pressures at generations F6, F7, F8 (for the deltamethrin line only) and F9-10 were calculated from tube bioassays performed on individuals at the preceding generation. Our specific aim was to determine the concentration needed to reach the lethal dose planned for the experiment, e.g. LD40 for F6, which corresponds to the dose that kills 40% of the exposed individuals. Tube bioassays were conducted in the exact same condition as the experimental selection experiment: hemolysis tubes were filled with artificial rearing diet without formaldehyde, on which 15µl of insecticide solution were added. After 3 hours of drying, one neonate (larvae collected at hatching) was placed in each tube closed with a cotton ball. Tubes were then placed in different transparent plexiglass boxes (30x20x15cm) in function of treatments, doses, lines and dates, then stored in standard conditions (23 ± 2 °C, RH 65 ± 5% and 16:8 L:D h). After 3 weeks, tubes where the larvae did not survive were thrown away, cotton balls were removed from tubes with alive individuals and strips of corrugated cardboard were added in boxes to favour nymphosis. Around 3 weeks later, adult emergences were checked daily.

Finally, the different doses applied at generations 6, 7 and 9 were calculated using the same statistical framework used for the microplate dose-response bioassays (see Material and Methods).

## **Appendix S2: Microplate dose-response bioassays**

Microplate bioassays were conducted to get an indication on the susceptibility of the initial population (P0) and of the F9-10 sub-lines. The initial population was tested for the three insecticides used in this study and each F9-10 sub-line was tested on the insecticide used for its selection. Bioassays on a susceptible reference strain were also conducted. To that aim, ingestion bioassays in 96-well microtiter plates were conducted on the progeny of the generation tested, on 1st-instar larvae (Reyes & Sauphanor, 2008b). Each well was filled with ~150µl of artificial rearing diet (Stonefly diet, Wards Sciences), on top of which 6µl of insecticide solution was added. To fit dose-response curves, we tested six increasing concentrations with at least 24 larvae per concentration. After 30 min of drying, neonates (larvae collected at hatching) were placed individually in each well, then closed hermetically with Parafilm strips. The microtiter plates were placed in standard conditions (23 ± 2°C, RH 65 ± 5% and 16:8 L:D h) for 7 days after which the percentage of mortality for each insecticide concentration was assessed visually: larvae were considered dead when not responding to a physical stimulation with fine clip and missing larvae were subtracted from the initial larvae number.

For each sub-line (generation F9-10), the bioassays performed on the three replicates were pooled after checking for their consistency. Dose-response curves were fitted using a 3-parameter log-probit model included in the 'drc' package in R (R Core Team, 2022; Ritz, 2020b). To check whether the selected lines were less susceptible than the susceptible reference strain, we performed t-tests to compare LD50 (i.e. Lethal Dose 50, the dose killing 50% of the exposed individuals) using the compParm function of the 'drc' package. Resistance ratios (RR) were obtained by dividing LD50 of the different lines with those of the reference susceptible strain.

### **Appendix S3: Candidate genes database**

Based on knowledge on genes associated with resistance mechanisms in insects, we identified a list of candidate genes for which annotation was checked more in depth compared to the automatic annotation of *C. pomonella* genome (from Siegwart, 2021). This database has been made from the first version of the automatic annotation of the genome (CpomGenome-1), which can be accessed at <http://www.insect-genome.com/cydia/>, using different keywords related to resistance mechanisms (e.g. P450, carboxylesterases, glutathione S-transferase, acetylcholine receptor, ryanodine receptor, ABC transporters, etc.), using the UGENE software. The identities of the resulting genes were then verified via Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) against the NCBI non-redundant (NR) database along with a PSI-BLAST (Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool) to verify if the conserved domains of each potential gene family were present in the annotated gene. This gene list was further validated manually using the GenSAS platform v6.0 (Humann et al., 2019).

# Chapitre 3 – Identification de marqueurs génomiques liés à la résistance aux insecticides par utilisation de séquençage génomique à haut-débit

## I. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons cherché à identifier des gènes impliqués dans la résistance aux pesticides via une approche basée sur des analyses transcriptomiques, sur des individus issus des 3 lignées sélectionnées respectivement avec du chlorantraniliprole, de la deltaméthrine et du spinosad lors d'une évolution expérimentale.

Après analyse des profils d'expression génique et des polymorphismes existants au sein des transcrits, nos résultats nous ont permis d'identifier :

- D'une part : des gènes déjà connus pour être impliqués dans des mécanismes de détoxification (comme des cytochromes P450 et des GST)
- D'autre part : des gènes n'ayant pas été identifiés comme impliqués dans des mécanismes de résistance (mais connus dans les systèmes olfactifs et odorants ou la réponse au stress).

Cependant, l'approche basée sur l'étude des niveaux de transcription des gènes ne permet l'étude que d'une partie des mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance aux insecticides. Pour mieux couvrir cette diversité de mécanismes, nous avons choisi de compléter les analyses transcriptomiques par une approche de génomique consistant au séquençage de tout le génome de pools d'individus. La complémentarité de ces deux approches est importante : elle a déjà été démontrée dans d'autres études, notamment sur le sujet des résistances aux insecticides (Battlay et al., 2016; Ingham et al., 2021), où différents mécanismes moléculaires entrent en jeu. En plus de permettre la détection de variants génétiques d'intérêts, l'approche génomique permet d'étudier les zones non-codantes du génome qui ne sont pas couvertes par les analyses de transcriptomes.

Par exemple, les bases génétiques des résistances aux pesticides peuvent être liées à :



- Des mutations ponctuelles : avec l'exemple de la mutation *kdr*, où la substitution L1014F au sein du gène *para*, codant pour un canal sodique au niveau d'axones confère une résistance aux pyréthriinoïdes chez de nombreuses espèces. (Soderlund, 2008)
- Des insertions d'éléments transposables : le transposon de classe I 'Accord', va par exemple conférer une résistance au DDT chez *D. melanogaster* et *D. simulans*, en faisant office de séquence régulatrice de type 'enhancer' sur le gène *CYP6G1*. (Rostant et al., 2012)
- Une mutation dans les régions régulatrices de gènes. Il a été montré qu'une mutation dans les régions régulatrices d'une Glutathione S-transferase-2 chez *Ae. aegypti* conférait une résistance au DDT (Grant & Hammock, 1992).
- Une modification du nombre de copies d'un gène via une amplification génique, qui va augmenter le nombre de copies de gènes et entraîner une surexpression du gène concerné (Bass & Field, 2011). Dans le contexte de la résistance aux insecticides, ce mécanisme est très présent dans les cas où des estérases sont impliquées dans les résistances (Feyereisen, 1995).

Malgré l'existence de tous ces mécanismes, l'architecture génétique des résistances est le plus souvent décrite dans la littérature par l'occurrence de mutations ponctuelles (SNPs) et d'amplifications géniques (CNVs) (Feyereisen, 1995). L'amplification génique est connue dans plusieurs cas de résistance non liée à la cible (NTSR). Dans le cas de la résistance aux insecticides, ce type de mécanisme est considéré comme peu coûteux (Assogba et al., 2015; French-Constant & Bass, 2017), et va induire une augmentation de l'expression du gène via l'augmentation du nombre de copies exprimées de ce gène. Ce phénomène est souvent associé aux gènes de détoxification. Par exemple, dans le cas de la résistance de *M. persicae* aux organophosphorés et carbamates, le nombre de copies du gène de l'estérase E4 peut atteindre jusqu'à 80 copies dans les souches résistantes par rapport aux souches sensibles (Field et al., 1999). Ou encore chez *Ae. aegypti*, où la résistance à des organophosphorés est causée par une amplification de carboxylestérase, allant de 3 à 80 copies chez différentes populations résistantes (Cattell et al., 2020).

Chez le carpocapse des pommes, les modifications connues pour conférer des résistances aux insecticides sont des mutations ponctuelles, notamment dans les résistances aux pyréthriinoïdes (mutation *kdr*) ou aux organophosphorés (mutation *MACE*). En ce qui concerne

les mutations entraînant une surexpression d'un gène, il a été montré que des mutations dans la région promotrice de CYP6B2 étaient associées à une résistance à la deltaméthrine et à l'aziphos-méthyl, en provoquant une augmentation de l'expression de ce gène (Wan et al., 2019). Pour ce qui est des événements d'amplification génique, il n'en a pour l'instant pas été identifié chez *C. pomonella*.

## II. Objectifs de ce chapitre

Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre est d'identifier des marqueurs génomiques liés à la résistance aux insecticides par l'étude comparative des variants génétiques dans le génome des populations soumises ou non à une pression de sélection insecticide par l'utilisation de séquençage génomique à haut-débit.

Pour cela nous avons choisi trois approches différentes afin d'identifier les loci et zones d'intérêts :

- 1) Tout d'abord une approche basée sur la variation des fréquences de mutations dans une population en fonction de la pression de sélection à laquelle elle a été soumise, via l'application de différents filtres sur les fréquences alléliques de nos échantillons.
- 2) Nous avons ensuite effectué une recherche de signatures de sélection par scans génomiques basés sur une approche bayésienne de l'analyse de ces fréquences alléliques en lien avec le phénotype des populations (via l'attribution d'un phénotype pour chacune des lignées et sous-lignées, permettant ensuite d'associer les variations de fréquences alléliques aux différents phénotypes).
- 3) Enfin nous avons cherché à détecter si des évènements d'amplification génique avaient eu lieu, en calculant si des variations dans le nombre de copies de gènes étaient présentes dans nos différentes lignées et sous-lignées.

L'analyse de variations génomiques au sein des différentes lignées créées suite à l'évolution expérimentale va nous permettre :

- D'identifier des modifications génétiques associées à la résistance aux différentes substances actives (chlorantraniliprole, deltaméthrine, spinosad).
- D'observer si cette association correspond à des mécanismes de résistance déjà connus ou si de nouveaux mécanismes peuvent être envisagés.
- D'identifier si les mécanismes de résistances pointés par nos analyses sont communs entre lignées sélectionnées avec 3 différentes substances actives.
- D'identifier les types de modification génétique les plus répandus au sein de cette évolution expérimentale.

### III. Matériel et méthodes

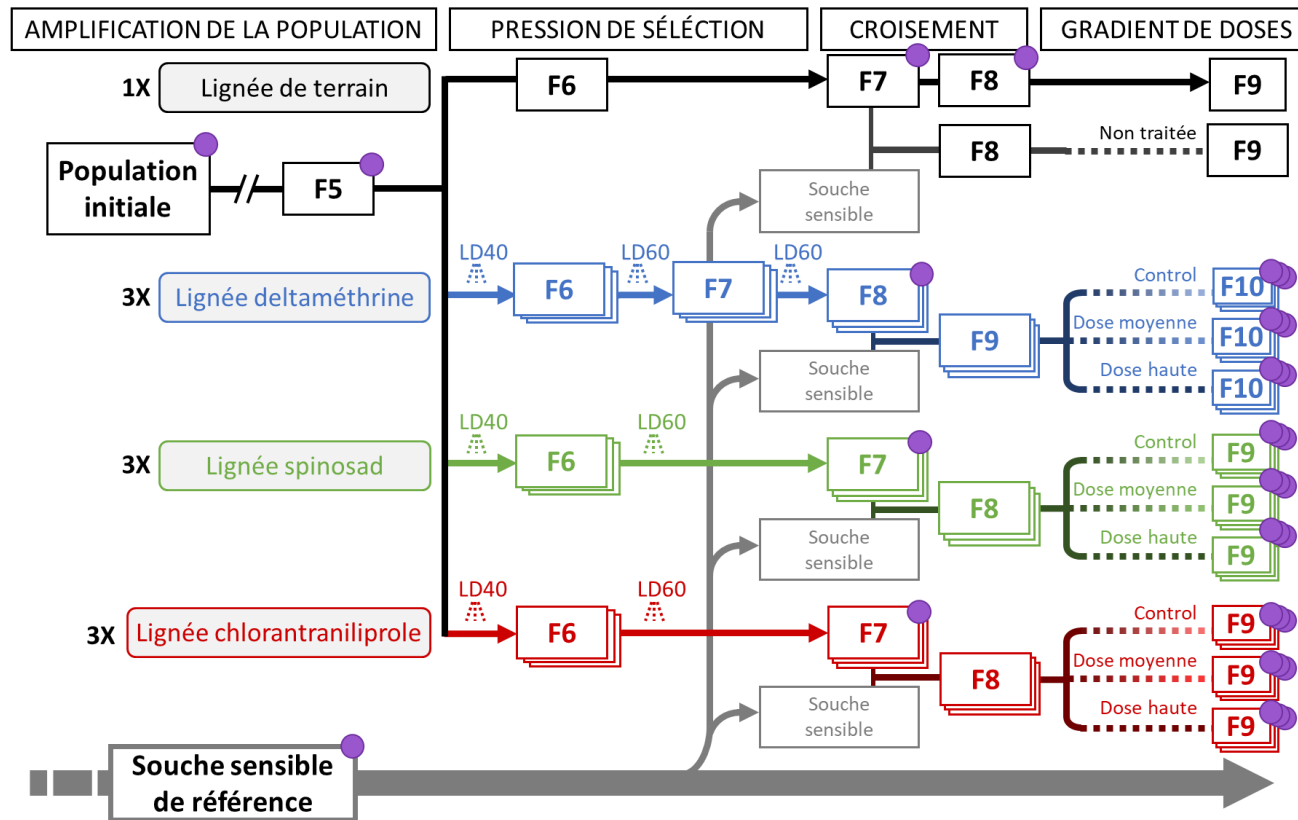
#### a. Matériel biologique, extraction ADN et séquençage

Nous avons choisi de séquencer des pools d'individus de générations particulières, correspondant à des étapes ayant reçu des pressions de sélection quantifiées de l'expérimentation : notre population initiale (G0), la génération juste avant le début des pressions de sélection (G5), les générations précédant le croisement avec la souche sensible (G7-8), ainsi que toutes les sous-lignées de la dernière génération (G9-10) (voir Figure 21 et Tableau 6).

Les extractions d'ADN total ont été faites avec le kit Qiagen Blood & Cell Culture DNA Mini Kit. Pour chaque génération et sous-lignée choisie pour être séquencée, l'objectif a été d'avoir 100 individus par extraction avec un sex-ratio équilibré lorsque le matériel biologique le permettait. Nous avons choisi de ne pas descendre en dessous de 45 individus pour chaque pool (cf. Tableau Nb indivs). Les individus ont été immergés dans de l'éthanol à 70° après s'être reproduits et stocké à 4°C jusqu'à l'extraction de leur ADN total. Cette extraction a été faite sur les thorax des adultes coupés en deux, poolés par environ 50 thorax et immergés dans 10 ml de tampon G2 additionné de protéase, puis incubés à 56°C toute une nuit. Les étapes suivantes ont été effectuées selon les instructions du fabricant.

Un contrôle de l'intégrité et de la pureté de l'ADN extrait a été effectué par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et par calcul du rapport A260/A280, évalué à l'aide d'un Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). La quantité exacte d'ADN a été mesurée à l'aide du kit PicoGreen dsDNA Assay (Molecular Probes). Pour limiter les biais de taille entre sexe, les mâles et les femelles ont été séparés avant l'extraction, puis leur ADN a été mélangé en tenant compte des effectifs et de la concentration de chacun afin d'obtenir une concentration équimolaire entre mâles et femelles dans le pool d'ADN final qui a été envoyé à séquencer.

Les 35 pools résultants des extractions ont été séquencés par la société BGI, selon la méthode 'Paired End 150 whole genome DNBseq technologies'.



**Figure 19 :** Schéma du design expérimental. Les ronds violets correspondent aux générations pour lesquelles des pools d'individus ont été séquencés.

Génération	Lignée	Dose	Réplica	Nombre de mâles	Nombre de femelles
G0	NA	NA	NA	50	50
G5	NA	NA	NA	50	50
G7	CHL	NA	NA	30	25
G7	SPI	NA	NA	16	34
G7	Témoin	NA	NA	50	50
G8	DEL	NA	NA	35	32
G8	Témoin	NA	NA	50	50
G9	CHL	0	R1	45	37
G9	CHL	0	R2	34	38
G9	CHL	0	R3	41	45
G9	CHL	25	R1	50	50
G9	CHL	25	R2	45	52
G9	CHL	25	R3	50	52
G9	CHL	75	R1	50	50
G9	CHL	75	R2	50	50
G9	CHL	75	R3	50	50
G9	SPI	0	R1	50	50
G9	SPI	0	R2	51	50
G9	SPI	0	R3	54	60
G9	SPI	25	R1	46	46
G9	SPI	25	R2	51	50
G9	SPI	25	R3	37	29
G9	SPI	75	R1	54	52
G9	SPI	75	R2	43	36
G9	SPI	75	R3	39	41
G10	DEL	0	R1	43	45
G10	DEL	0	R2	31	40
G10	DEL	0	R3	45	35
G10	DEL	50	R1	58	49
G10	DEL	50	R2	50	50
G10	DEL	50	R3	44	47
G10	DEL	75	R1	22	29
G10	DEL	75	R2	23	27
G10	DEL	75	R3	22	23
G10	TSV	NA	NA	50	50

**Tableau 6 :** Nombre de mâles et femelles présents dans les différents échantillons en pool utilisés lors des analyses génomiques

## b. Analyses bio-informatiques

### i. Recherche de variants

Un contrôle de la qualité des séquences obtenues a été réalisé en utilisant le logiciel FastQC (Babraham Bioinformatics). Les séquences brutes ont été filtrées sur leur longueur et leur qualité ( $> Q30$ ) en utilisant le logiciel TrimGalore v.0.6.5, (Krueger et al., 2015) avec les paramètres suivants : (*stringency: 3, minimum length: 25 bp, trimming of Ns from either side of the reads* (--stringency 3 --length 25 --trim-n).

Les adaptateurs de séquençage DNBseq (-a AAGTCGGAGGCCAAGCGGTCTTAGGAAGACAA & -a2 AAGTCGGATCGTAGCCATGTCGTTCTGTGAGCCAAGGAGTTG) ont également été renseignés afin de vérifier qu'ils ont bien été supprimés.

Les séquences ont ensuite été alignées sur le génome de référence V1 de *C. pomonella* (<http://v2.insect-genome.com/Organism/224>) grâce à l'algorithme BWAmem (v.0.7.17, Li & Durbin, 2009). Les fichiers d'alignement ont été compressés en fichiers BAM en utilisant SAMtools v. 1.14 (H. Li et al., 2009) et les duplicats de PCR ont été retirés avec l'option 'RemoveDuplicates' de la suite Picard Tools (v.2.20.7, Broad Institute). En fonction des analyses souhaitées, les fichiers BAM filtrés ont été combinés en utilisant le programme mpileup de SAMtools pour effectuer la recherche de variants avec le logiciel VarScan v2.3.6, (Koboldt et al., 2012), avec l'option *mpileup2cns* et les paramètres suivants : (*-min-coverage 10 ; -min-var-freq 0.05, -min-avg-qual 20, chi2 0.8*)

Le fichier vcf de sortie de ces traitements a été filtré avec la fonction vcf2pooldata du package R PoolFStats (Gautier et al., 2022), en ne gardant que les variants bialléliques avec une couverture  $>4$  reads dans toutes les populations, une *Minimum Allele Frequency*  $> 0.05$ , les SNPs ayant une profondeur supérieure au 99ème percentile (biais de séquençage, zones répétées...) ont été supprimés. Enfin, la fonction pooldata2genobypass du même package a été utilisée pour générer les fichiers d'entrée nécessaires au logiciel BayPass.

### ii. Analyses de diversité génétique

Afin de quantifier la perte de diversité génétique au cours de l'évolution expérimentale, le  $P_i$  de Tajima a été estimé pour tous les échantillons analysés à l'échelle du génome avec PoPoolation2 (Kofler et al., 2011). Seuls les échantillons pour lesquels la profondeur de séquençage moyenne sur tout le génome était supérieure à 20X ont été inclus dans cette analyse (éliminant 2 échantillons). Le  $P_i$  de Tajima a été calculé dans des fenêtres glissantes

non chevauchantes de 100 pb. Les seuils suivants ont été posés pour chaque fenêtre : profondeur moyenne de séquençage de 10X minimum, profondeur maximale de 1000X et au moins 50% de la fenêtre atteignant ces seuils dans tous les échantillons. Ainsi, le  $P_i$  de Tajima a été calculé sur 120 116 356 fenêtres remplissant ces critères sur l'ensemble des 32 échantillons.

Pour comparer chaque paire d'échantillon, des tests de rangs signés de Wilcoxon ont été effectués avec une correction pour les tests multiples selon la méthode de Holm. Toutes les statistiques ont été effectuées sous R.

iii. Recherche de signatures de sélection

1. Analyse par filtrage de fréquences alléliques

Nous avons adopté une approche par filtrage selon les variations de fréquences alléliques des mutations en fonction des pressions de sélection appliquées, à l'image de ce qui a été fait dans le chapitre 2, dans le but d'identifier des variants (mutation ponctuelles seules ou insertions ou délétions) associés à la résistance aux insecticides. Cette analyse a été effectuée séparément pour chaque lignée sélectionnée.

Les règles auxquelles doivent répondre Les SNPs pour être considérées comme associées aux résistances par la première méthode d'analyse utilisée, dite par filtrage de fréquences alléliques, sont récapitulées dans le tableau suivant :

Variation minimale des fréquences alléliques <sup>1</sup>			
Entre F5 et F8	Entre F8 et F9 <sub>c</sub>	Entre F9 <sub>c</sub> et F9 <sub>DM</sub>	Entre F9 <sub>c</sub> et F9 <sub>DH</sub>
Augmentation	Diminution	Augmentation	Augmentation

<sup>1</sup> Des conditions réciproques ont été appliquées pour les allèles sélectionnés négativement

**Tableau 7 :** Conditions pour qu'un SNP passe les filtres de fréquences alléliques

Les SNPs retenus après application de ces filtres ont été représentés graphiquement selon leur augmentation en points de pourcentage entre les sous-lignée F9<sub>c</sub> et F9<sub>DH</sub> (Figures 26,30 et 34).

Le nombre de de SNPs hautement associés, c'est-à-dire les 1% présentant la plus forte augmentation en points de pourcentage entre les sous-lignée F9<sub>c</sub> et F9<sub>DH</sub> ont été dénombrés dans des fenêtres glissantes de 50Kb et chevauchantes avec un pas de 5Kb le long des chromosomes et représentés sous forme de Manhattan plot (Figures 27, 31 et 35). Un seuil de 3 SNPs hautement associés présents dans une fenêtre a été retenu afin de déterminer des



fenêtres candidates et des zones candidates lorsque plusieurs fenêtres candidates se chevauchaient. Nous avons ensuite cherché à identifier les gènes présents au sein de ces zones.

## 2. Analyse par scan génomique

Un deuxième type d'approche s'est concentré sur des scans génomiques d'association, qui ont été effectués en utilisant la méthode bayésienne implémentée dans le logiciel BayPass v. 2.3 (Gautier, 2015). Cette approche se base sur la corrélation entre variables environnementales et fréquences alléliques et va permettre d'étudier l'association entre génotype et phénotype de nos lignées et sous-lignées. Dans notre étude, cela va permettre d'associer les signatures de sélections identifiées avec la résistance aux différentes substances actives. Le logiciel BayPass permet de prendre en compte la structure des populations étudiées (et dans notre cas de pouvoir prendre en compte la structure entre nos différents réplicas). L'analyse a été faite séparément pour chaque lignée sélectionnée. Toutes les analyses de scans génomiques d'association ont été effectuées sous le modèle standard (*standard covariate model*). Ce type d'analyse n'étant pas adapté à l'analyse de générations successives, nous avons choisi de les appliquer aux différentes sous-lignées de la dernière génération seulement (F9 pour les lignées spinosad et chlorantraniliprole ou F10 pour les lignées deltaméthrine).

Les SNPs localisés sur les autosomes (chromosomes 2 à 28) et chromosomes sexuels (Z et W ; 1 et 29) ont été analysés séparément pour tenir compte de leur ségrégation et ploïdie (dans le pool) différentes. Suivant les recommandations d'utilisation du logiciel, nous avons divisé chaque jeu de données en sous-ensembles contenant seulement un SNP tous les 4 SNP pour le chromosome Z/W et un tous les 100 pour les autosomes soit 4 sous-ensembles pour Z/W et 100 pour les autosomes représentant environ 80K SNP chacun. Ces sous-ensembles ont été analysés en parallèle, en utilisant les options par défaut de l'algorithme MCMC (méthode de Monte-Carlo par chaînes de Markov), en incluant les options *-scalecov* pour assurer une mise à l'échelle correcte de la covariable populationnelle. La covariable que nous avons utilisé pour renseigner les niveaux de résistance des différentes sous-lignées est la mortalité observée dans parmi les individus des sous-lignées au cours de l'évolution expérimentale.

Les estimations des hyper-paramètres du modèle ont ensuite été calculés entre tous les sous-jeux de données, notamment au niveau des matrices  $\Omega$  de covariance des fréquences alléliques, qui quantifient la relation génétique entre chaque paire de sous-lignées. Une analyse de type ACP (analyse en composantes principales) a également été conduite en utilisant la

décomposition spectrale de la matrice de covariance  $\Omega$  (avec la fonction `plot.omega`), pour décrire la structuration génétique des sous-lignées entre elles. La différenciation adaptative globale (qui serait due à toutes les pressions sélectives dont d'autres que celles imposées par l'évolution expérimentale) a également été calculée et prise en compte, en se basant sur le calcul des statistiques  $XtX$ , qui décrivent la structuration génétique globale et l'histoire évolutive de nos échantillons. Ces analyses ont été faites sur tous les échantillons puis sur chaque lignée séparément (*i.e.* CHL, DEL et SPI).

Le niveau d'association entre chaque SNP et la résistance des sous-lignées a été mesuré grâce à l'indice appelé Bayes Factor (BF). Les BFs sont mesurés en unités décibel (db), les valeurs entre 15 et 20 db traduisant une 'très forte preuve' et des valeurs  $> 20$  db traduisant une 'preuve décisive' de l'association du SNP avec le phénotype d'intérêt, d'après la règle de Harold Jeffreys (Jeffreys, 1961).

Dans notre jeu de données, les SNPs présentant un  $BF \geq 15$ db et une statistique  $XtX$  présente dans le 99<sup>e</sup> quantile de la distribution empirique des  $XtX$ , ont été considérés comme SNPs fortement associés à la résistance.

Toutes les figures et les manipulations de résultats ont été effectués sous R.

### 3. Analyse du variation de nombre de copies de gènes

Le dernier type d'analyse appliquée sur les données a été de compter les variations dans le nombre de copies de gènes (CNV) afin d'identifier de potentielles duplications de gènes en lien avec les pressions de sélection exercées. Cette analyse se base sur les valeurs de couverture génomique suite au séquençage, où une couverture anormalement haute sera synonyme d'augmentation du nombre de copies du gène concerné.

Cette analyse a été effectuée séparément pour chaque réplica de chaque lignée, en utilisant les générations F5, F8 et F9-10, pour associer les CNV aux pressions de sélection appliquées sur nos lignées et sous-lignées. Tous les échantillons pris en compte dans l'analyse d'un réplica devaient avoir une profondeur de séquençage moyenne d'au moins 20X. Les échantillons ayant une couverture inférieure ont été analysés selon des conditions différentes.

Nous avons adapté la méthode utilisée par Cattel et al. (2019) : en premier lieu, nous avons filtré les régions exoniques d'au moins 45 bp de long dont la couverture moyenne était comprise entre 20 et 800 X dans tous les échantillons de l'analyse. Pour chaque échantillon, les

couvertures d'exons ont été normalisées selon la taille de la librairie mappée, puis ont été utilisées pour calculer des nombres de copies. Ce nombre de copies a été normalisé selon une référence commune créée à partir des données tous les échantillons de l'analyse. Enfin, pour chaque gène la moyenne du nombre de copies normalisé de l'ensemble des exons le composant a été calculée.

Un gène a été considéré comme enrichi sous pression insecticide si le nombre de ses copies normalisé suivait les conditions du tableau ci-dessous. Le seuil de 0.2 est dû au fait que nos analyses ont été effectuées sur des pools d'une centaine d'individus.

F5 à F8	F8 à F9 <sub>c</sub>	F9 <sub>c</sub> à F9 <sub>MH</sub>
Augmentation > 0.2	Diminution < 0.2	Augmentation > 0.2 <b><i>ou</i></b>
		F9 <sub>c</sub> à F9 <sub>DH</sub>
		Augmentation > 0.2

**Tableau 8 :** Conditions pour qu'un gène soit considéré comme enrichi dans les analyses de CNV

Comme dit précédemment, les deux échantillons ayant eu une couverture < 20X étant DEL R1 75 et DEL R2 75, les conditions suivantes ont été appliquées pour les réplicas 1 et 2 des lignées deltaméthrine :

F5 à F8	F8 à F9 <sub>c</sub>	F9 <sub>c</sub> à F9 <sub>DM</sub>
Augmentation > 0.2	Diminution < 0.2	Augmentation > 0.2

**Tableau 9 :** Conditions pour qu'un gène soit considéré comme enrichi pour les échantillons DEL R1 75 et DEL R2 75

L'identification de tous les gènes ressortant des différentes analyses a été faite grâce à leur annotation issue de l'annotation de référence (<http://v2.insect-genome.com/Organism/224>). Une analyse des termes de Gene Ontology a aussi été effectuée, en se basant sur les ressources liées à la V2 du génome de *C. pomonella* et grâce à la plateforme WEGO 2.0 (Ye, Jia, et al., 2018). Nous nous sommes également concentrés sur la présence parmi les gènes retenus de

certaines issus de la base de données listant des gènes appartenant à des familles de gènes connus pour être impliqués dans des résistances aux insecticides (Siegwart, 2021).

## IV. Résultats

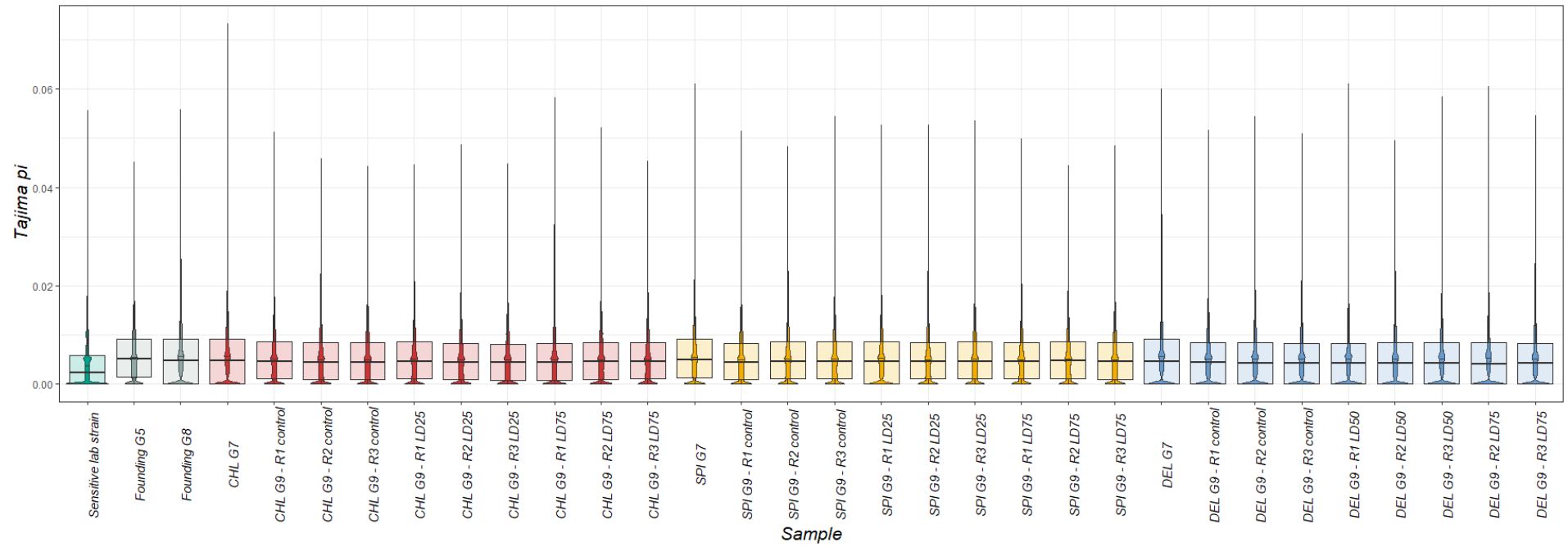
### a. Diversité génétique et structuration des échantillons au court de l'expérimentation

La diversité génétique de nos différents échantillons (estimée par le calcul du  $\pi$  de Tajima) a été comparée à la population sensible de référence présente au laboratoire (SV). Le  $\pi$  de Tajima a été calculé comme étant significativement plus élevé dans tous les échantillons à partir de la génération F5 par rapport à la population SV, à hauteur de 31,2 % en moyenne. Tous les échantillons des générations suivant la F5 ne sont pas significativement différents (Tests de Wilcoxon,  $p < 0.001$ ) (Figure 20).

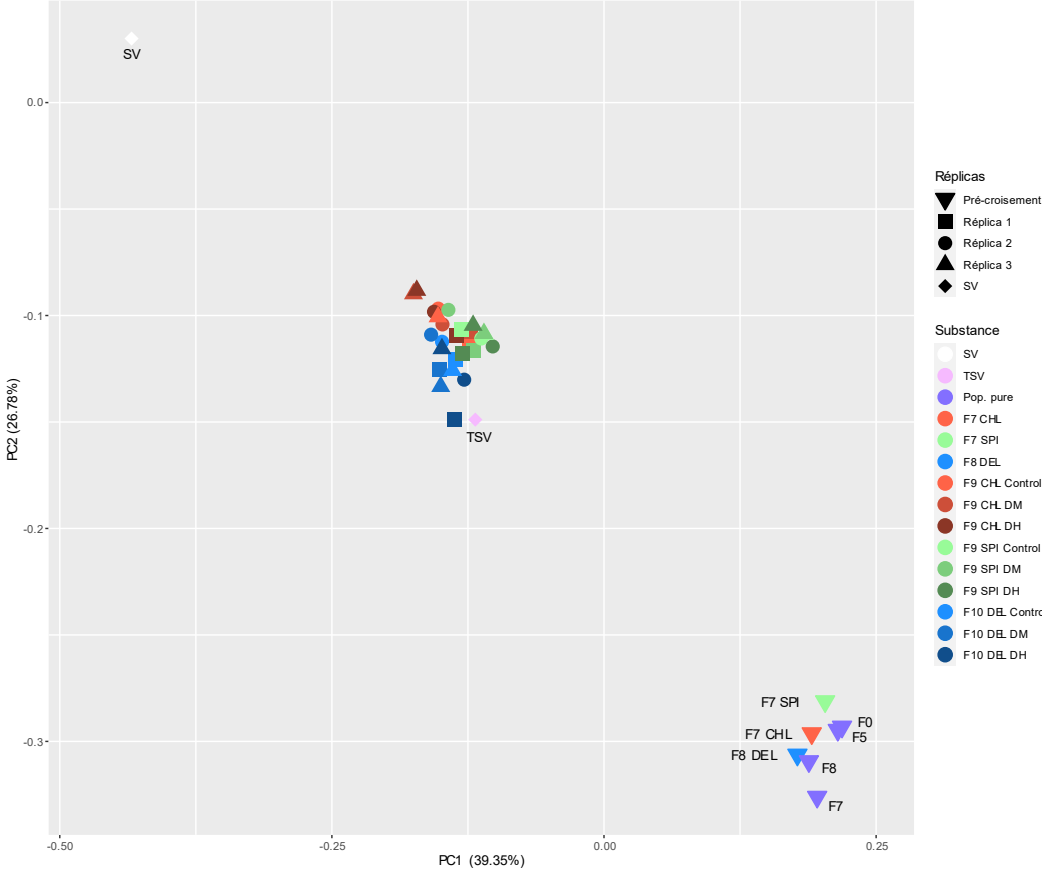
Trois clusters sont ressortis de l'ACP effectuée sur tous nos échantillons (Figure 21). Un premier, composé de la population sensible de référence (SV), ensuite se trouvent tous les individus hybrides issus du croisement de la population sauvage avec la souche sensible de référence : toutes les sous-lignées de la dernière génération ainsi que la première lignée hybride. Enfin un dernier cluster se compose de toutes les générations composées à 100% de la population sauvage avant le croisement avec la souche sensible de référence.

En regardant plus précisément toutes les sous-lignées de la dernière génération ainsi que la lignée hybride, on peut voir que les échantillons se regroupent par substance active et par réplica plutôt que par intensité de pression de sélection. De plus, on peut remarquer un rapprochement entre un réplica du chlorantraniliprole et un du spinosad : les réplica 1 dans les deux cas. Il ressort clairement que le troisième réplica de la lignée deltaméthrine se différencie du reste des lignées (Figure 22).

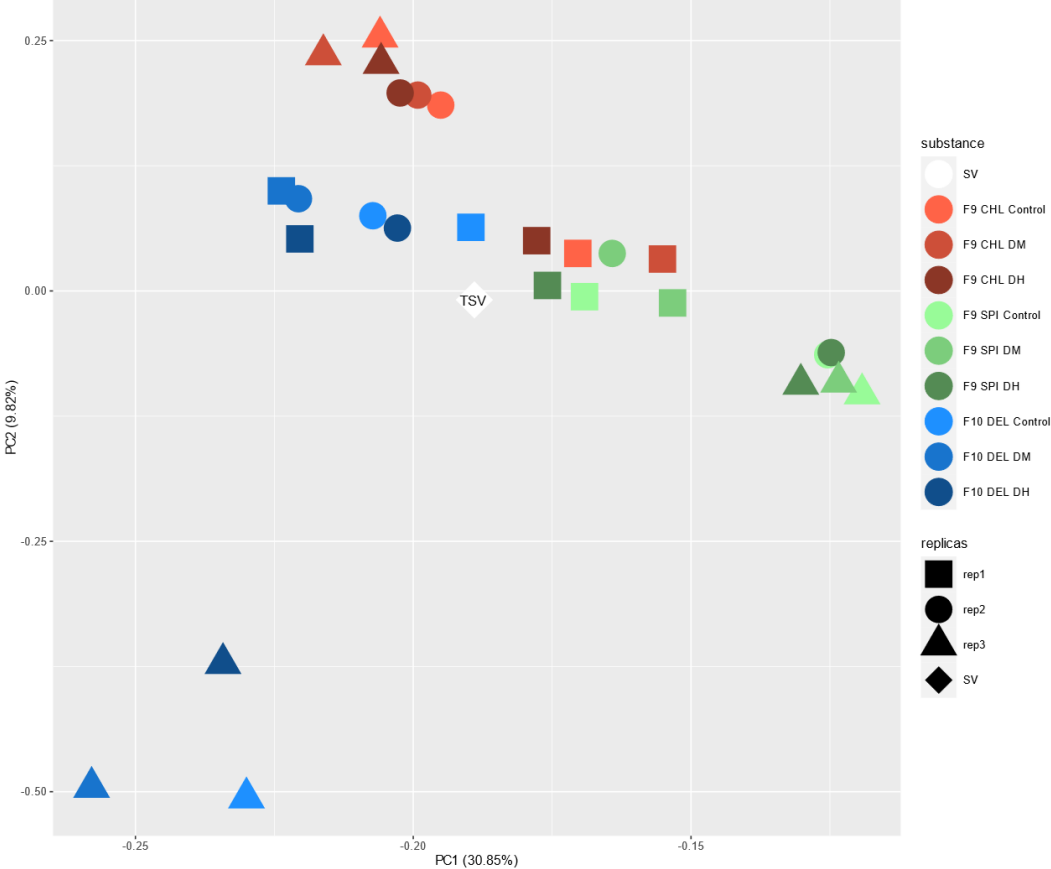
De la même manière, lorsque cette analyse est réalisée lignée par lignée, on peut voir distinctement les sous-lignées se regrouper selon le réplica plutôt que par intensité des pressions de sélection appliquées (Figures 23 à 24).



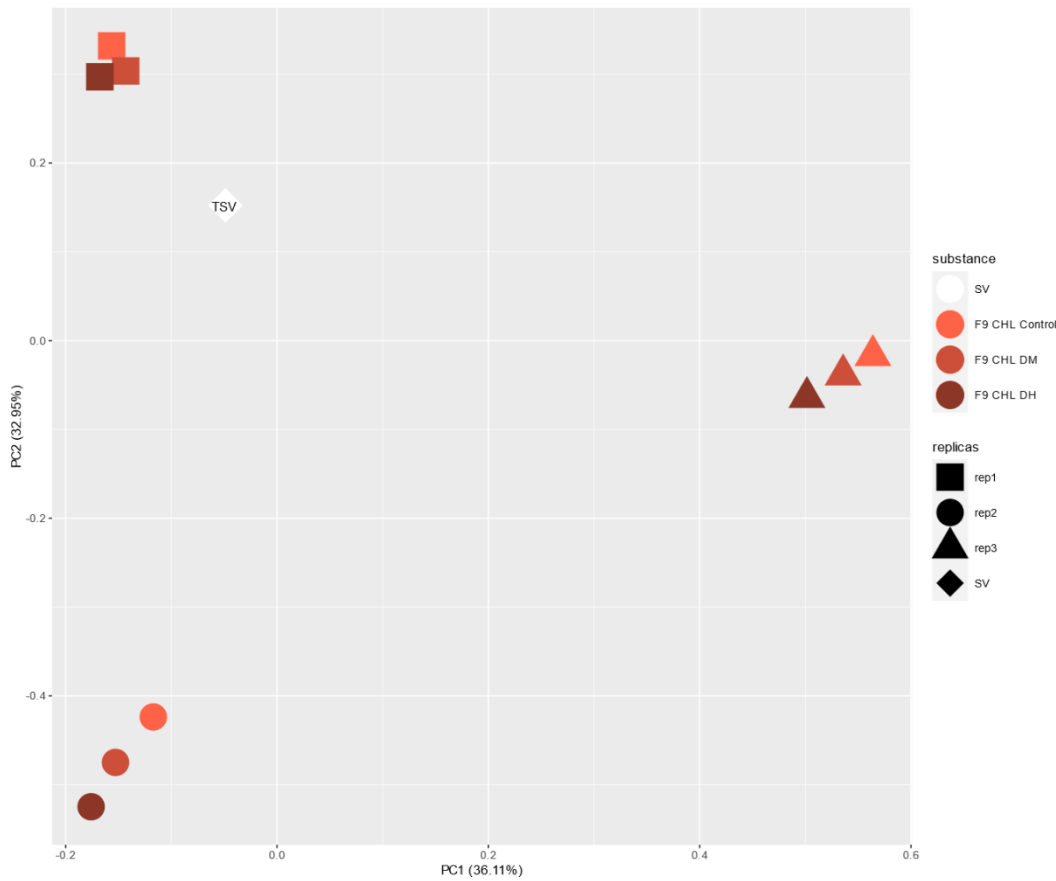
**Figure 20 :** Représentations des Pi de Tajima des différents échantillons séquencés



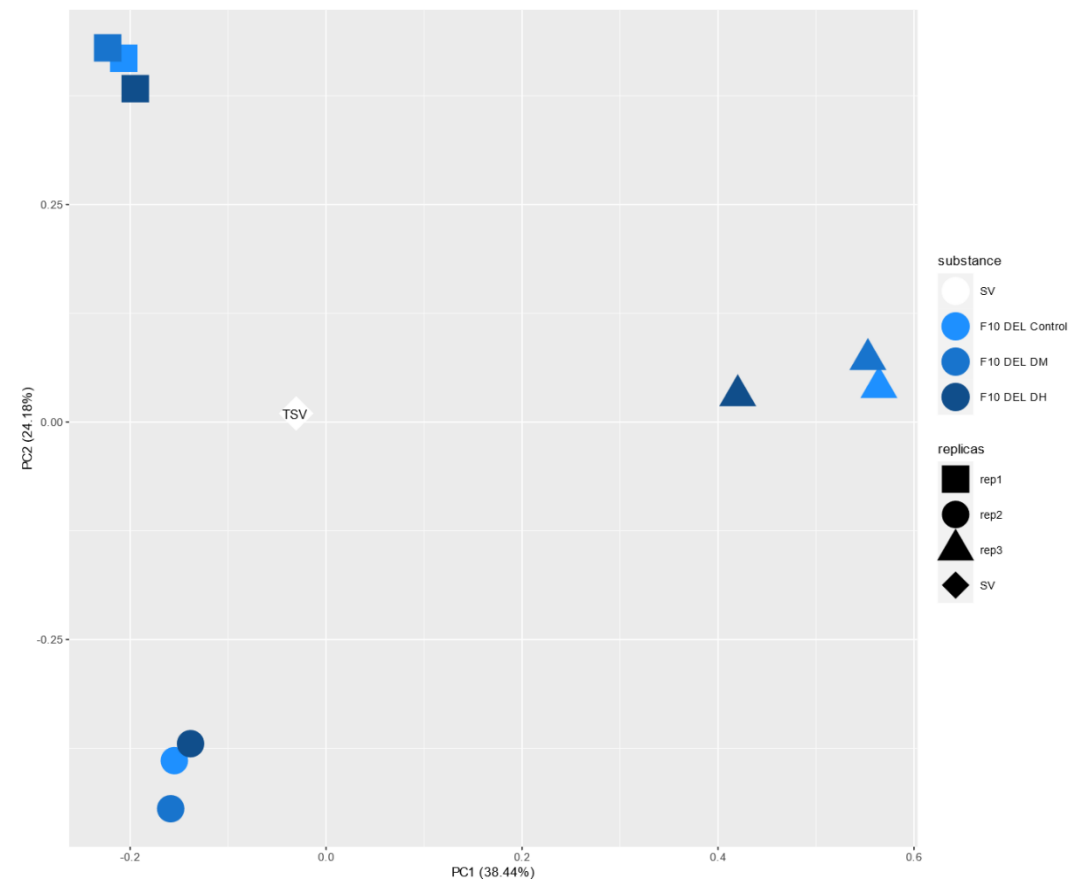
**Figure 21 :** ACP effectuée sur tous les échantillons séquencés



**Figure 22 :** ACP effectuée sur tous les échantillons issus des dernières générations de l'expérience (F9 et F10)

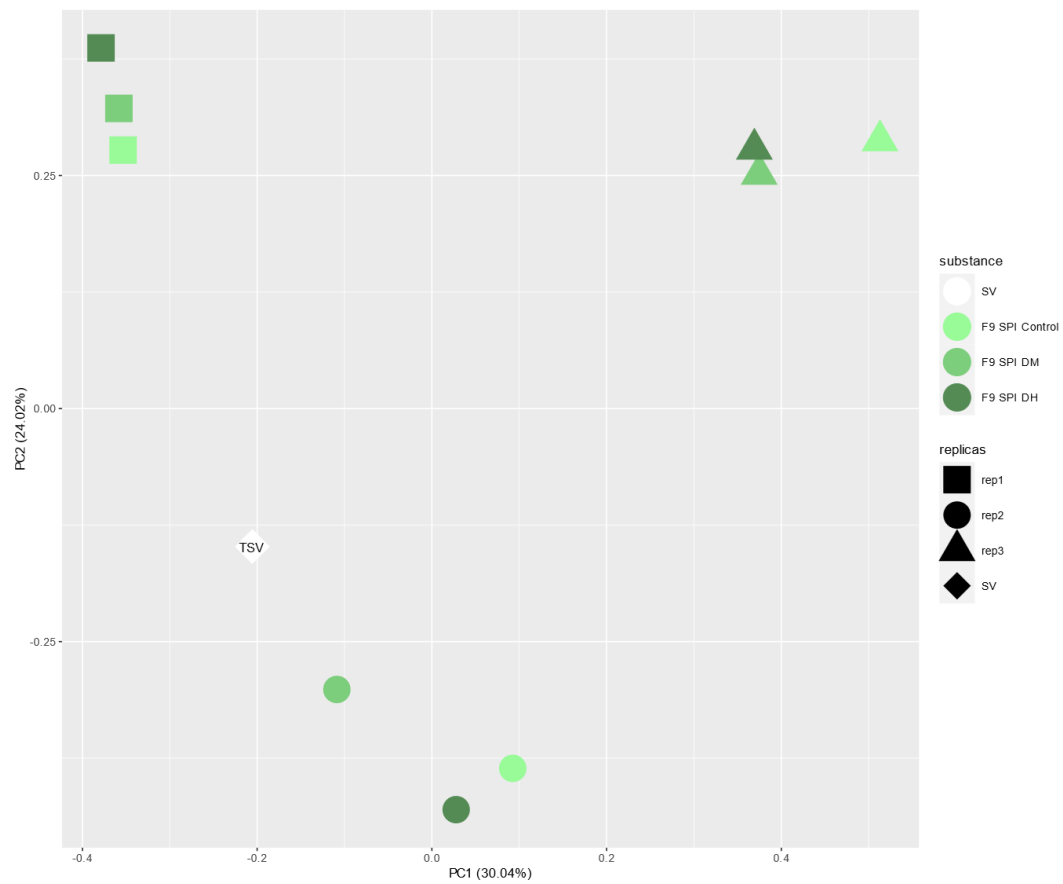


**Figure 23 :** ACP effectuée sur les échantillons issus de la lignée TSV et des sous-lignées Chlorantraniliprole



**Figure 24 :** ACP effectuée sur les échantillons issus de la lignée TSV et des sous-lignées Deltaméthrine





**Figure 25 :** ACP effectuée sur les échantillons issus de la lignée TSV et des sous-lignées Spinosad

## b. Recherche de signatures de sélection

### i. Chlorantraniliprole

#### 1. Approche par filtrage de fréquences alléliques

Pour les lignées CHL, 131 082 SNP ont passé les différents filtres de fréquence allélique. Le positionnement de ces mutations (Figure 26, représentation sous forme d'un Manhattan plot) montre une répartition homogène le long du génome. On peut également remarquer que la variation de fréquence allélique entre les conditions Control (C) et Haute Dose (HD) est faible pour la majorité des SNP ayant passé les filtres. Les 1% des SNPs ayant le plus variés (Top 1%) ne compte qu'une différence de 21,3 points en moyenne.

Le décompte du nombre de SNP par fenêtres de 50kb nous a permis d'identifier 249 fenêtres porteuses d'au moins 3 mutations hautement significatives. Lorsque deux fenêtres cibles sont contiguës entre nous les avons regroupées en zones dites d'intérêt. Au total 34 zones d'intérêt sont révélées par nos analyses. On retrouve des zones sur les chromosomes suivants : 2, 6, 7, 10, 14, 17 à 24 et 29, avec en moyenne 1 à 2 zones pour chaque chromosome, à l'exception du chromosome 2 où l'on en retrouve 6 (Figures 27 et 38 A).

Au sein de ces zones, on retrouve un seul gène issu de notre liste de gènes candidats : un probable cytochrome P450 6a17 (cpo028190). Une grande partie des gènes qui ont pu être identifiés n'ont pas d'annotation (putative uncharacterized proteins) et la majorité des autres gènes sont impliqués dans des mécanismes liés au transport intracellulaire, d'après leur annotation en gene ontology (Tableau 10)

#### 2. Approche par scan génomique

En complément de l'approche par filtres, peu stringente, une approche par scan génomique a été utilisée. Ici 100 fois moins de SNP que l'approche par filtres sont ressortis de cette analyse. Ainsi, 1 330 SNP ressortent comme étant significativement corrélées à la résistance au chlorantraniliprole ( $BF > 15$ ). Même si l'on conserve les 1% des SNPs ayant les plus forts BF ('top 1%') cela constitue seulement 69 714 SNPs soit la moitié du nombre de SNP sélectionnés par la technique des filtres.

Comme pour l'approche par filtres les SNPs identifiés grâce à BayPass ont été positionnés le long du génome pour identifier les zones porteuses de forte densité de SNPs que nous supposons soumises à sélection par le chlorantraniliprole (Figure 28)

Dans la représentation du 1% supérieur, on peut voir trois pics de différenciation clairs, situés dans les chromosomes 1, 12 et 17 avec des BF dépassant les 35. D'autres pics de moindre hauteur mais ayant une valeur de BF > 15 sont également visibles sur les chromosomes 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 17, 20 et 21. En regardant plus précisément la densité des SNP ayant un BF > 15 (Figure 29), on peut voir que 6 zones sont porteuses d'au moins 3 SNP avec un BF > 15 : dans les chromosomes 4, 11, 15, 18 et 27 dont 2 régions dans le chromosome 11. Il est intéressant de noter que les SNPs qui sont très fortement associés à la résistance ne sont pas situés dans les zones à forte densité de SNP.

Une analyse snpEff a ensuite été conduite sur les SNPs à BF > 15, afin d'avoir une idée de leur effet sur l'expression de gènes ou la structure des protéines grâce à leur localisation par rapport aux ORFs en se basant sur l'annotation du génome de référence.

Parmi les SNPs ayant un BF > 15 sur tout le génome, 36 sont situés dans des exons dont 23 sont des variants non-synonymes (étants tous dans des gènes n'ayant pas d'annotation) et 11 sont des variants synonymes. 319 SNP se trouvent dans les zones précédant un gène (jusqu'à 5kb de l'extrémité 5'), 114 se trouvent dans la zone en aval d'un gène (jusqu'à 5kb de l'extrémité 3'), et 892 dans les zones intergénomiques (Tableau 20).

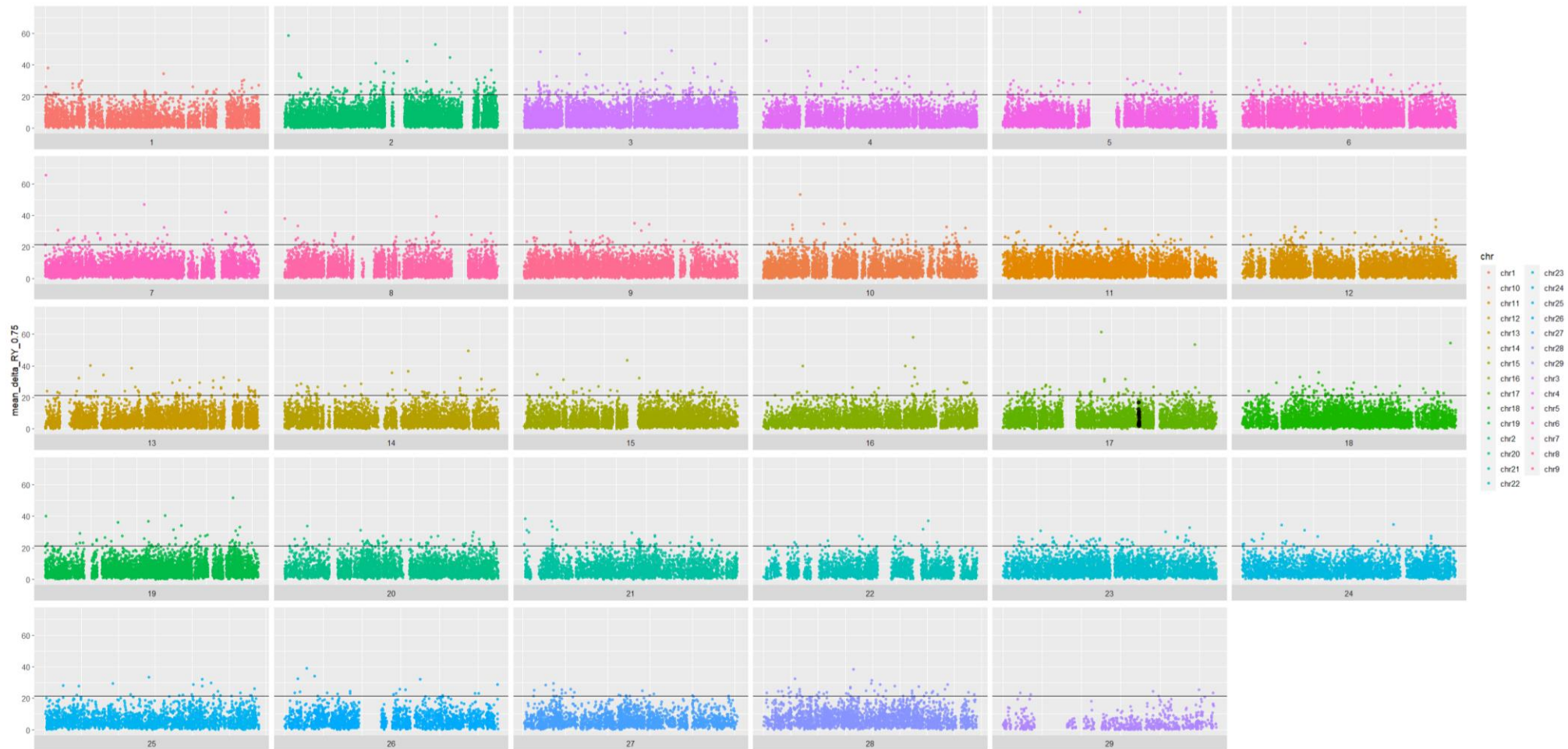
Au total, 246 gènes ayant une annotation issue du génome de référence ont été identifiés dans les zones contenant une densité de 'SNP significatifs' supérieure ou égale à trois par fenêtre de 50 Kb. Parmi ceux-ci, on trouve 14 gènes présents dans la liste de gènes candidats.

Parmi les gènes candidats pour lesquels un signal significatif est détecté par scan génomique, on retrouve 4 cytochromes P450 : 2 CYP4C1, CYP6B2, CYP6j1 (cpo140530, cpo029930, cpo042380, cpo163730 respectivement), 2 ABC transporteurs (MSTRG.14952, MSTRG.20587), une estérase (cpo026490) et une protéine cuticulaire (cpo019490). On retrouve également 5 protéines impliquées dans le métabolisme énergétique (Tableau 11).

### 3. Détection de variations du nombre de copies de gènes

Ici les analyses ont été effectuées séparément sur chacun des réplicas. 726 gènes ont vu leur nombre de copies augmenter lorsqu'une pression de sélection avec le chlorantraniliprole a été appliquée et diminué en absence de pression de sélection. Parmi ces gènes, 37 font partie des candidats précédemment identifiés sur la base des connaissances bibliographiques (Tableau 12). Parmi ces gènes il y a 2 cytochromes P450 : CYP6I1 (cpo163720) et CYP6B2 (cpo145930),

ce dernier se retrouvant dans 2 répliques (R1 et R2). Plusieurs gènes codant pour des ABC transporteurs des familles A, D et G (cpo026070, cpo021590, cpo142400, cpo136020, cpo170660) sont présents dans chacun des répliques. Différentes protéines impliquées dans la formation de la cuticule ont également vu leur nombre s'accroître : des protéines présentes dans la formation de la cuticule au stade adulte, nymphal et larvaire (cpo020820, cpo023530 et cpo019530 ; cpo085230, cpo023520 et cpo098370 ; cpo074980) dans les répliques 2 et 3. Enfin, deux gènes qui codent pour des protéines qui entrent dans la composition de l'endocuticule, localisés dans une fenêtre de 200 kb sur le chromosome 5 ont vu leur nombre augmenter avec la sélection et ce dans les 3 répliques (Endocuticle structural glycoprotein ABD-4 et SgAbd-2 : cpo019630 et cpo019580, cpo019660).



**Figure 26 :** Manhattan plot représentant Les SNPs ayant passé les différents filtres de fréquences, selon leur variation entre les conditions C et HD, pour les lignées chlorantraniliprole. Les SNPs présents au-dessus de la ligne noire font partie des 1% les plus variés. La zone noire sur le chromosome 17 correspond au gène « voltage-gated sodium channel» où se trouve la mutation *kdr*.



**Figure 27 :** Manhattan plot des SNP ayant passé les différents filtres de fréquences pour les lignées chlorantraniliprole, en fenêtres glissantes de 50kb, selon le nombre de SNP présents au sein des 1% les plus variés



**Figure 28 :** Manhattan plot représentant Les SNPs faisant partie des 1% qui ont les BF les plus élevés, pour les lignées chlorantraniliprole



**Figure 29:** Manhattan plot représentant le nombre de SNP ayant des BF > 15, en fenêtres glissantes de 50kb, pour les lignées chlorantraniliprole



Lignée	Gene ID	Annotation	Gène candidat
Chlorantraniliprole	cpo000680	Uncharacterized protein K02A2.6	
	cpo000690	Uncharacterized protein K02A2.6	
	cpo002060	KRAB-A domain-containing protein 2	
	cpo002070	Vitellin-degrading protease	
	cpo002640	Centrosome-associated protein CEP250	
	cpo002650	Putative uncharacterized protein	
	cpo002660	Ras-related protein Rap1	
	cpo004050	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	
	cpo004060	Putative uncharacterized protein	
	cpo004070	Putative uncharacterized protein	
	cpo004990	Homeotic protein deformed	
	cpo005000	Homeotic protein deformed	
	cpo009400	Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-4	
	cpo009410	Putative uncharacterized protein	
	cpo009420	Cyclin-dependent kinase 10	
	cpo009430	Methionine aminopeptidase 1D, mitochondrial	
	cpo009440	Protein N-terminal glutamine amidohydrolase	
	cpo009550	Death-inducer obliterator 1	
	cpo009560	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	
	cpo009570	Protein argonaute-2	
	cpo009580	Protein argonaute-2	
	cpo009590	Tumor protein D54	
	cpo009600	Mariner Mos1 transposase	
	cpo012800	Solute carrier organic anion transporter family member 4A1	
	cpo012810	Putative uncharacterized protein	
	cpo012820	Obscurin	
	cpo015050	Metal-response element-binding transcription factor 2	
	cpo015060	Leucine-rich repeat-containing protein 57	
	cpo015070	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha	
	cpo015080	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha	
	cpo015090	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha	
	cpo019850	Broad-complex core protein isoforms 1/2/3/4/5	
	cpo019860	Nuclear migration protein nudC	
	cpo019870	Putative uncharacterized protein	
	cpo019880	Nuclear migration protein nudC	
	cpo026880	Acetylcholine receptor subunit beta-like 2	
	cpo028090	Putative uncharacterized protein	
	cpo028100	Putative uncharacterized protein	
	cpo028110	Furin-like protease 1, isoforms 1/1-X/2	
	cpo028160	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 3-like protein 3	

Lignée	Gene ID	Annotation	Gène candidat
Chlorantraniliprole	cpo028170	Casein kinase I isoform gamma-3	CP.17g449680.m01
	cpo028180	Alpha-tocopherol transfer protein-like	
	cpo028190	Probable cytochrome P450 6a17	
	cpo028200	A-kinase anchor protein 17A	
	cpo028210	Putative uncharacterized protein	
	cpo028220	Arrestin domain-containing protein 17	
	cpo028230	Solute carrier family 12 member 2	
	cpo028290	Probable ribosome biogenesis protein RLP24	
	cpo028300	Neither inactivation nor afterpotential protein G	
	cpo028310	Retinol dehydrogenase 13	
	cpo028680	Protein disconnected	
	cpo028700	Protein disconnected	
	cpo028750	Phorbol ester/diacylglycerol-binding protein unc-13	
	cpo028760	Putative uncharacterized protein	
	cpo028770	Putative uncharacterized protein	
	cpo028780	Putative uncharacterized protein	
	cpo028790	Protein unc-13 homolog A	
	cpo028800	Protein unc-13 homolog B	
	cpo028810	Protein unc-13 homolog B	
	cpo028860	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	

**Tableau 10 :** Gènes pour lesquels un SNP a passé les filtres de fréquence alléliques et l'indication du gène candidat associé, pour les lignées chlorantraniliprole (avec correspondance avec les identifiants du génome de référence 'Gene ID' ou de notre base de données de gènes candidats 'Gène candidat')

Chr	position	Gene ID	Transcript ID	Gène candidat	Annotation
chr03	14634011		MSTRG.20587.1	CP.03g084300.m01	ATP-binding cassette sub-family G member 4
chr05	6309726	cpo019490		CP.05g149430.m01	Flexible cuticle protein 12
chr07	29820868	cpo140530		CP.07g222310.m01	Cytochrome P450 6j1
chr08	1869637	cpo026490		CP.08g226370.m01	Esterase FE4
chr10	12223524	cpo049580		CP.10g281440.m01	HEAT repeat-containing protein 6
chr12	6574439	cpo085980		CP.12g323940.m01	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial
chr13	5636139	cpo035810		CP.13g349830.m01	Putative oxidoreductase GLYR1 homolog
chr13	10018265	cpo037240		CP.13g355950.m01	Phospholipid-transporting ATPase ABCA1
chr13	25053454		MSTRG.6050.1	CP.13g369270.m01	Probable cytochrome P450 301a1, mitochondrial
chr14	16548923	cpo137540		CP.14g386220.m01	Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase pipe
chr17	20481585	cpo029930		CP.17g456080.m01	Cytochrome P450 4C1
chr20	12140058	cpo042380		CP.20g511680.m01	Cytochrome P450 4C1
chr21	15064342		MSTRG.14952.5	CP.21g532410.m01-00001	ABC transporter G family member 23
chr27	12496842	cpo163730		CP.27g618820.m01-00002	Cytochrome P450 6B2

**Tableau 11 :** SNPs identifiés suite au scan génomique, localisés dans des gènes appartenant à notre liste de gènes candidats (avec correspondance avec les identifiants du génome de référence 'Gene ID' ou de notre transcriptome 'Transcript ID') pour les lignées chlorantraniliprole

Lignée	Réplica	Chromosome	Gene ID	Annotation
Chlorantranilprole	R1	Chr 3	cpo136020	ATP-binding cassette sub-family G member 4
		Chr 5	cpo019630	Endocuticle structural glycoprotein ABD-4
		Chr 5	cpo019580	Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2
		Chr 11	cpo140980	Sulfotransferase 1C4
		Chr 20	cpo039870	Sulfotransferase 1A1
		Chr 23	cpo070100	Glucose-6-phosphate isomerase
		Chr 27	cpo145930	Cytochrome P450 6B2
	R2	Chr 1	cpo014980	Carbohydrate sulfotransferase 3
		Chr 3	cpo170660	ATP-binding cassette sub-family G member 4
		Chr 5	cpo142400	ATP-binding cassette sub-family D member 3
		Chr 5	cpo021590	ATP-binding cassette sub-family D member 3
		Chr 5	cpo020820	Cuticle protein 19
		Chr 5	cpo020000	Putative uncharacterized protein
		Chr 5	cpo019630	Endocuticle structural glycoprotein ABD-4
		Chr 5	cpo019580	Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2
		Chr 7	cpo011630	Microsomal glutathione S-transferase 1
		Chr 8	cpo158880	Carbohydrate sulfotransferase 11
		Chr 8	cpo023530	Cuticle protein 3
		Chr 8	cpo025090	Carbohydrate sulfotransferase 11
		Chr 8	cpo026140	Retinal-specific phospholipid-transporting ATPase ABCA4
		Chr 12	cpo085230	Pupal cuticle protein 20
		Chr 12	cpo085310	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial
		Chr 14	cpo147220	Glucose-fructose oxidoreductase domain-containing protein 1
		Chr 22	cpo074980	Larval cuticle protein LCP-17
		Chr 23	cpo070100	Glucose-6-phosphate isomerase
		Chr 27	cpo163720	Cytochrome P450 6I1
		Chr 27	cpo145930	Cytochrome P450 6B2

Lignée	Réplica	Chromosome	Gene ID	Annotation
Chlorantraniliprole	R3	Chr 1	cpo014980	Carbohydrate sulfotransferase 3
		Chr 1	cpo148490	Probable multidrug resistance-associated protein lethal(2)03659
		Chr 5	cpo019530	Cuticle protein CP14.6
		Chr 5	cpo019660	Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2
		Chr 5	cpo020000	Putative uncharacterized protein
		Chr 8	cpo026070	ATP-binding cassette sub-family A member 17
		Chr 8	cpo023520	Pupal cuticle protein 36
		Chr 11	cpo140980	Sulfotransferase 1C4
		Chr 21	cpo064360	Putative uncharacterized protein
		Chr 27	cpo098370	Pupal cuticle protein PCP52

**Tableau 12 :** Gènes appartenant à la liste de gènes candidats ayant leur nombre de copies enrichi pour les lignées chlorantraniliprole

## ii. Deltaméthrine

### 1. Approche par filtrage de fréquences alléliques

Au total, 79 296 SNP ont passé les filtres pour la lignée deltaméthrine. Comme pour le chlorantraniliprole, on voit sur la représentation graphique en Manhattan plot que les différents SNP retenus suite à l'application des filtres ne sont pas localisés dans une zone particulière. De plus, aucun pic de différenciation entre les sous-lignées C et DH n'est présent dans ce jeu de données. Cependant, une large zone est clairement plus impactée que le reste du génome au niveau du chromosome 17, celle-ci correspond au locus de la mutation *kdr*. Comme pour le chlorantraniliprole, les changements de fréquence allélique reste modérés : les 1% de SNP les plus polymorphes ont un changement de fréquence de 34 points entre les sous-lignées control (C) et celles soumises à une forte dose de deltaméthrine (HD). (Figure 30)

Nous avons également conduit une analyse en fenêtres glissantes de 50kb, qui a permis de délimiter 360 fenêtres, formant au total 32 zones d'intérêt dans le génome. On peut remarquer un regroupement de 17 zones dans le chromosome 17. (Figures 31 et 38 B)

Dans les zones ayant une densité de, SNP passant les filtres, supérieure ou égale à 3 SNP/50kb, on retrouve un gène présent dans la liste de gènes candidats : une gamma-glutamylcyclotransférase (*cpo054730*) pouvant être impliquées dans le catabolisme de la glutathione, une molécule importante dans les mécanismes de détoxification. Comme dans les données issues des lignées chlorantraniliprole, on retrouve une grande partie des gènes sans annotation (putative uncharacterized proteins) et la majorité des autres gènes sont impliqués dans des mécanismes liés au à la régulation de processus cellulaires ou métaboliques. (Tableau 13)

### 2. Approche par scan génomique

En ce qui concerne les lignées sous sélection de deltaméthrine, parmi Les SNPs présents dans notre jeu de données, 54 313 faisaient partie du 1% des plus forts BF et 1 696 ont eu un BF > 15 dans ce 1% supérieur.

Une représentation graphique en fenêtres glissantes a été effectuée, afin de visualiser les zones ayant les densités de SNP les plus élevées.

Comme précédemment ce type d'analyse permet de visualiser plus clairement des pics d'association. Dans la représentation du top 1% des BF, on peut voir trois différents pics, dont

un situé dans le chromosome 2 et deux situés dans le chromosome 29 qui n'est autre que le chromosome sexuel W (présent uniquement chez les femelles). On peut remarquer toute une zone présentant un renflement avec de nombreux SNP ayant un BF > 20 au niveau du chromosome 17. (Figure 32)

En localisant Les SNPs ayant un BF > 15, on peut distinguer 25 zones ayant au minimum 3 SNP dont les deux zones en début et fin de chromosome 29 porteuses respectivement de 4 et 5 SNP significatifs (Figure 33).

Comme précédemment, le positionnement des mutations par rapport aux ORFs a montrés que 28 SNP sont des variants non-synonymes, 17 sont des variants synonymes. À propos de leur localisation : 418 se trouvent dans la zone en amont de gènes (jusqu'à 5kb de l'extrémité 5'), 155 se trouvent dans la zone en aval de gènes (jusqu'à 5kb de l'extrémité 3'), et 1102 dans les zones intergéniques. (Tableau 20).

Au total, 325 gènes issus de l'annotation du génome de référence ont été identifiés dans les zones à forte densité de SNP significatifs. Parmi ceux-ci, on trouve 39 gènes présents dans la liste de gènes candidats. Parmi les gènes candidats identifiés, on retrouve des ABC transporteurs (cpo026070, cpo044070, cpo149950, MSTRG.20978, MSTRG.14952), des UDP-glucosyltransferase (cpo053710, cpo052480), des cytochromes P450 6k1 et 6a17 (cpo030310, cpo028190) et une protéine cuticulaire (cpo085220), une '*multidrug resistance associated protein*' (MSTRG.20887) et deux estérases (cpo003260, cpo026490). On retrouve également des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique et des protéines neuronales. Dix-sept gènes n'ayant pas de correspondance avec l'annotation de référence ont également été identifiés. (Tableau 14).

### 3. Détection de variations du nombre de copies de gènes

Comme indiqué précédemment, sur 2 des 3 répliques de notre lignée DEL, nous avons dû faire face à un problème de couverture de séquençage. En effet, les répliques 1 et 2 ont eu un pourcentage de couverture inférieur à 20X pour les sous-lignées HD (Haute Dose). Par conséquence, le pipeline d'analyse a dû être modifié en éliminant les sous-lignées HD des filtres pour les 2 répliques concernés (cf. Matériel et méthodes, II. b. iii. .3).

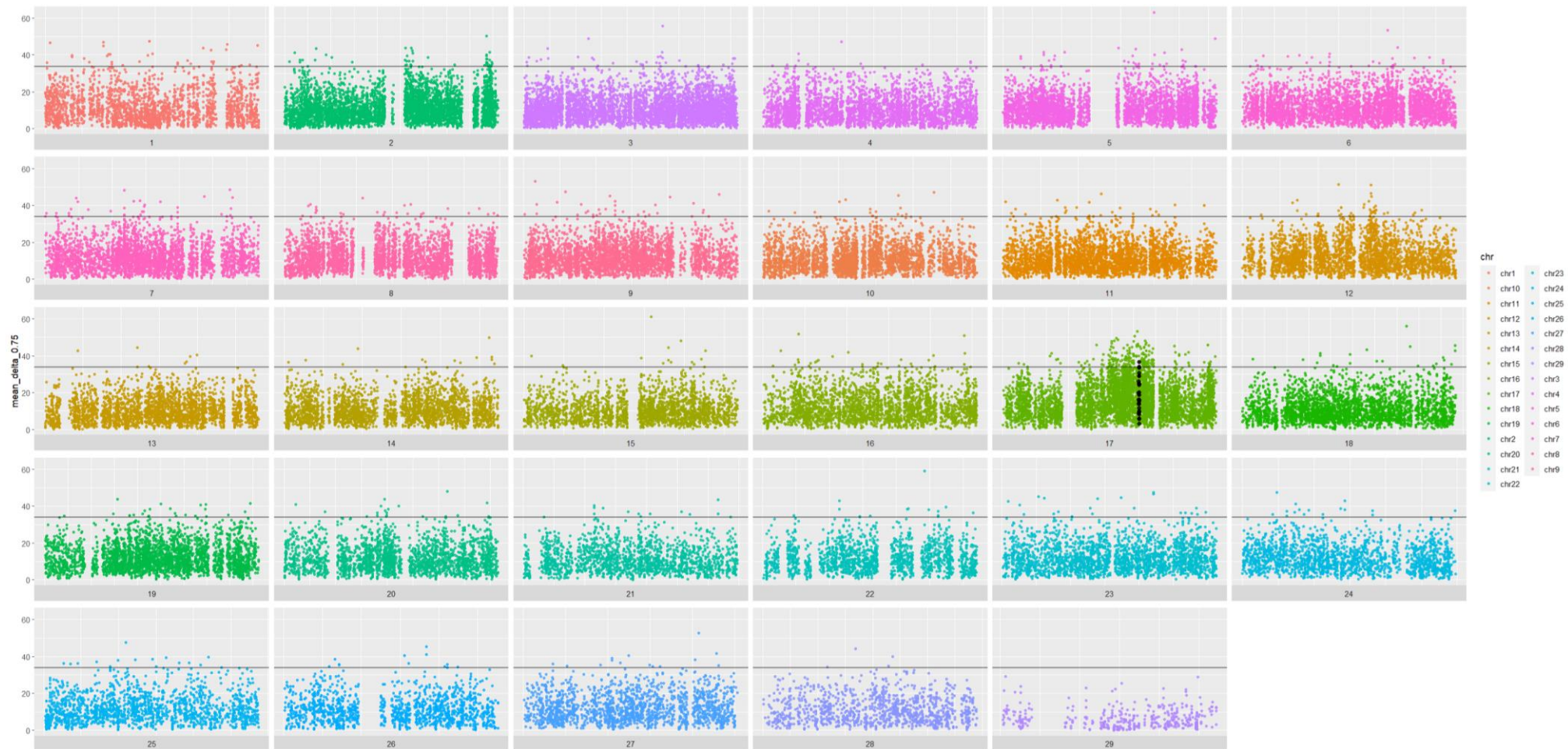
Pour ces deux répliques, 2542 gènes au total ont passé nos filtres, dont 103 gènes sont présents sur la liste de candidats, soit 4%. Le réplique 3 n'a quant à lui pas eu problème de couverture et

le filtre standard lui a été appliqué. Au total, 808 gènes (3 fois moins que pour les 2 autres répliques) ont eu leur nombre de copies enrichi et 46 appartiennent à la liste de candidats, soit 5,7% (Tableau 15).

Parmi les gènes identifiés ceux présents dans les 3 répliques codent pour : un ABC transporteur (cpo115650), une carbohydrate sulfotransferase 3 (cpo014980), de l'actin-1 (cpo122460) et également différentes protéines associées à des multidrug resistance proteins : 3 multidrug resistance protein homolog (cpo124890, cpo124910 et cpo124940), localisées dans une zone de 40 kb, une probable multidrug resistance-associated protein (cpo015800) et une multidrug resistance-associated protein (cpo148500). Ces dernières se trouvent toutes sur le chromosome 1, correspondant au chromosome sexuel Z. D'autres ABC transporteurs (des familles A (cpo026120), B (cpo049610), D (cpo021590), F (cpo115650, cpo112920) et G (cpo046940, cpo046950) ressortent également comme étant associés à la résistance à la deltaméthrine dans un réplica indépendamment des autres.

Onze cytochromes P450 sont pointés par ces analyses de nombre de copie de gène : CYP4C1 (cpo022240), CYP4c3 (cpo022510), CYP4d2 (cpo092950), CYP4g15 (cpo159940), CYP4V2 (cpo047050), CYP6B1 (cpo065240), CYP6B2 (cpo062750), CYP6B6 (cpo021830), CYP6j1 (cpo014850), CYP6k1 (cpo030310), CYP9e2 (cpo130950).





**Figure 30 :** Manhattan plot représentant les SNPs ayant passé les différents filtres de fréquences, selon leur variation entre les conditions C et HD, pour les lignées deltaméthrine. Les SNPs présents au-dessus de la ligne noire font partie des 1% les plus variés. La zone noire sur le chromosome 17 correspond au gène « voltage-gated sodium channel» où se trouve la mutation *kdr*.



**Figure 31 :** Manhattan plot des SNP ayant passé les différents filtres de fréquences pour les lignées deltaméthrine, en fenêtres glissantes de 50kb, selon le nombre de SNP présents au sein des 1% les plus variés



**Figure 32 :** Manhattan plot représentant Les SNPs faisant partie des 1% qui ont les BF les plus élevés, pour les lignées deltaméthrine



**Figure 33 :** Manhattan plot représentant le nombre de SNP ayant des BF > 15, en fenêtres glissantes de 50kb, pour les lignées deltaméthrine

Lignée	Gene ID	Annotation	Gène candidat	
Deltaméthrine	cpo028870	Putative uncharacterized protein	CP.17g452050.m01	
	cpo028880	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 Q1		
	cpo028890	Putative uncharacterized protein		
	cpo028900	Ras GTPase-activating protein 1		
	cpo028910	Endophilin-A		
	cpo029060	Unconventional myosin-IXa		
	cpo029070	Ribosomal biogenesis protein LAS1L		
	cpo029080	Phospholipid-transporting ATPase ID		
	cpo029090	Methyl-CpG-binding domain protein 2		
	cpo029120	Cyclin-dependent kinase 7		
	cpo029130	DET1 homolog		
	cpo029140	Tyrosine-protein kinase CSK		
	cpo029150	Polyubiquitin-A		
	cpo029160	SURP and G-patch domain-containing protein 1		
	cpo029170	Craniofacial development protein 2		
	cpo029180	Protein Aster-B		
	cpo029200	Uncharacterized protein K02A2.6		
	cpo029210	Elongation factor-like GTPase 1		
	cpo029220	Elongation factor-like GTPase 1		
	cpo029240	Kin of IRRE-like protein 3		
	cpo029310	G-patch domain and KOW motifs-containing protein		
	cpo029320	Chromatin assembly factor 1 subunit A		
	cpo033720	Myosin-I heavy chain		
	cpo033730	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB7		
	cpo033740	Ras-related protein Rab-8A		
	cpo033750	Putative uncharacterized protein		
	cpo033760	Protein SEC13 homolog		
	cpo033770	DNA polymerase epsilon catalytic subunit 1		
	cpo041460	Probable 18S rRNA (guanine-N(7))-methyltransferase		
	cpo041470	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2		
	cpo041480	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2		
	cpo041490	Transmembrane emp24 domain-containing protein 2		
	cpo041500	Alpha-tocopherol transfer protein		
	cpo041510	RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey		
	cpo041520	Citron Rho-interacting kinase		
	cpo041530	Putative uncharacterized protein		
	cpo041540	Histone-lysine N-methyltransferase SETD1		
	cpo041660	Putative uncharacterized protein		CP.20g509690.m01
	cpo041670	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]		
	cpo041680	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		

Lignée	Gene ID	Annotation	Gène candidat
Deltaméthrine	cpo044410	Putative BEN domain-containing protein B1	
	cpo044550	Nose resistant to fluoxetine protein 6	
	cpo044560	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	
	cpo044570	Putative uncharacterized protein	
	cpo044580	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 7, mitochondrial	
	cpo045330	Integrin alpha-PS3	
	cpo046160	transcript/gène inexistant	
	cpo046170	Sodium-independent sulfate anion transporter	
	cpo046180	Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR	
	cpo046230	Craniofacial development protein 2	
	cpo046910	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	
	cpo046920	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	
	cpo050070	Allatostatin	
	cpo050220	Retrotransposable element SLACS 132 kDa protein	
	cpo051860	Putative uncharacterized protein	
	cpo051870	Calpain-7	
	cpo052280	Synapse-associated protein of 47 kDa	
	cpo053820	Semaphorin-5B	
	cpo054520	Coiled-coil domain-containing protein 174	
	cpo054530	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	
	cpo054540	RNA exonuclease 1 homolog	
	cpo054550	pas d'annotation	
	cpo054680	Intracellular coagulation inhibitor 1	
	cpo054690	Serine protease inhibitor 27A	
	cpo054700	Golgin subfamily A member 5	
	cpo054710	RalA-binding protein 1	
	cpo054720	Putative uncharacterized protein	
	cpo054730	Putative glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 2	CP.03g102710.m01
	cpo054740	Uncharacterized protein K02A2.6	
	cpo054750	CCR4-NOT transcription complex subunit 9	
	cpo054760	Putative uncharacterized protein	CP.03g102780.m01
	cpo054770	HEAT repeat-containing protein 5B	CP.03g102780.m01
	cpo054820	Putative uncharacterized protein	
	cpo054980	Putative uncharacterized protein	
cpo054990	Putative uncharacterized protein		
cpo055060	Tubulin polyglutamylase TTL4		
cpo055070	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG		

**Tableau 13 :** Gènes pour lesquels un SNP a passé les filtres de fréquence alléliques et l'indication du gène candidat associé, pour les lignées deltaméthrine

Chr	position	Gene ID	Transcript ID	Gène candidat	Annotation
chr2	17660444	cpo003260		CP.02g052330.m01	Esterase FE4
chr2	27014414	cpo004300		CP.02g057640.m01	Peroxidase
chr7	6408564	cpo008320		CP.07g204030.m01-00002	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-7
chr1	18102270	cpo015800		CP.01g010280.m01	Probable multidrug resistance-associated protein lethal(2)03659
chr8	4262161	cpo026070		CP.08g228690.m01	ATP-binding cassette sub-family A member 17
chr8	1864083	cpo026490		CP.08g226370.m01a	Esterase FE4
chr17	12603987	cpo028190		CP.17g449680.m01	Probable cytochrome P450 6a17
chr17	12603998	cpo028190		CP.17g449680.m01	Probable cytochrome P450 6a17
chr17	22155765	cpo030310		CP.17g457640.m01	Cytochrome P450 6k1
chr13	10039746	cpo037250		CP.13g355950.m01	Retinal-specific phospholipid-transporting ATPase ABCA4
chr20	17543887	cpo044070		CP.20g516520.m01a	ATP-binding cassette sub-family A member 5
chr3	26289316	cpo052480		CP.03g095100.m01	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
chr3	31766366	cpo053710		CP.03g100020.m01	UDP-glucosyltransferase 2
chr21	7516406	cpo063230		CP.21g525970.m01	Octopamine receptor beta-1R
chr12	10139231	cpo085220		CP.12g326480.m01	Pupal cuticle protein 20
chr4	37372010	cpo092500		CP.04g142260.m01	Heat shock protein beta-1
chr4	37372059	cpo092500		CP.04g142260.m01	Heat shock protein beta-1
chr5	26779638	cpo139100		CP.05g161870.m01-00002	Juvenile hormone esterase
chr14	9750005	cpo149950		CP.14g380860.m01	ATP-binding cassette sub-family G member 4
chr21	15115444		MSTRG.14952.5	CP.21g532410.m01-00002	ABC transporter G family member 23
chr3	23566112		MSTRG.20978.3	CP.03g092570.m01	ATP-binding cassette sub-family G member 4
chr3	20743212		MSTRG.20887.4	CP.03g090260.m01-00003	Multidrug resistance-associated protein 1
chr2	26991721		MSTRG.12810.3	CP.02g057640.m01	Peroxidase
chr2	27033873		MSTRG.12810.3	CP.02g057640.m01	Peroxidase
chr2	27104819		MSTRG.12810.3	CP.02g057640.m01	Peroxidase
chr13	25570529		MSTRG.6071.4	CP.13g369630.m01-00001	Phosphatidylcholine translocator ABCB4



Chr	position	Gene ID	Transcript ID	Gène candidat	Annotation
chr28	3296343		MSTRG.19271.1	CP.28g622120.m01	Probable multidrug resistance-associated protein lethal(2)03659
chr5	9180667		MSTRG.23382.2	CP.05g151570.m01	Putative uncharacterized protein
chr14	16526960		MSTRG.6850.7	CP.14g386220.m01	Putative uncharacterized protein
chr14	16528837		MSTRG.6850.7	CP.14g386220.m01	Putative uncharacterized protein
chr21	12055506		MSTRG.14845.2	CP.21g529910.m01	Putative uncharacterized protein
chr17	15638017		MSTRG.9737.11	CP.17g452370.m01	Sodium channel protein para
chr11	27290295		MSTRG.3938.5	CP.11g316880.m01	Pas d'annotation correspondante dans le génome de référence
chr2	43185921			CP.02g069870.m01	Pas d'annotation correspondante dans le génome de référence
chr2	43217954			CP.02g069890.m01	Pas d'annotation correspondante dans le génome de référence
chr20	2041482			CP.20g503520.m01	Pas d'annotation correspondante dans le génome de référence
chr5	23017483		MSTRG.23675.1	CP.05g158300.m01	Pas d'annotation correspondante dans le génome de référence
chr7	6572151		MSTRG.25860.1	CP.07g204030.m01-00002	Pas d'annotation correspondante dans le génome de référence
chr8	1873627			CP.08g226370.m01	Pas d'annotation correspondante dans le génome de référence

**Tableau 14 :** SNPs identifiés suite au scan génomique, localisés dans des gènes appartenant à notre liste de gènes candidats (avec correspondance avec les identifiants du génome ou de notre transcriptome) pour les lignées deltaméthrine



Lignée	Réplica	Chr	Gene ID	Annotation
Deltaméthrine	R1	Chr 1	cpo122460	Actin-1
		Chr 1	cpo115650	ATP-binding cassette sub-family F member 2
		Chr 1	cpo120460	Pickpocket protein 28
		Chr 1	cpo124940	Multidrug resistance protein homolog 49
		Chr 1	cpo124890	Multidrug resistance protein homolog 49
		Chr 1	cpo143160	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase S
		Chr 1	cpo148500	Multidrug resistance-associated protein 4
		Chr 1	cpo015800	Probable multidrug resistance-associated protein lethal(2)03659
		Chr 1	cpo015460	Multidrug resistance-associated protein 4
		Chr 1	cpo015440	Multidrug resistance-associated protein 4
		Chr 1	cpo014980	Carbohydrate sulfotransferase 3
		Chr 1	cpo014850	Cytochrome P450 6j1
		R2	Chr 1	cpo014850
	Chr 1		cpo014980	Carbohydrate sulfotransferase 3
	Chr 1		cpo015430	Multidrug resistance-associated protein 4
	Chr 1		cpo015440	Multidrug resistance-associated protein 4
	Chr 1		cpo015800	Probable multidrug resistance-associated protein lethal(2)03659
	Chr 1		cpo148500	Multidrug resistance-associated protein 4
	Chr 1		cpo143160	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase S
	Chr 1		cpo124890	Multidrug resistance protein homolog 49
	Chr 1		cpo124910	Multidrug resistance protein homolog 49
	Chr 1		cpo124940	Multidrug resistance protein homolog 49
	Chr 1		cpo115650	ATP-binding cassette sub-family F member 2
	Chr 1		cpo122460	Actin-1
	Chr 2	cpo002200	Glutathione S-transferase	
Chr 2	cpo002860	Glutathione S-transferase D1		
Chr 2	cpo003270	Esterase FE4		
Chr 2	cpo005620	Glutathione S-transferase 1, isoform D		
Chr 3	cpo046940	ATP-binding cassette sub-family G member 1		

Lignée	Réplica	Chr	Gene ID	Annotation
Deltaméthrine	R2	Chr 3	cpo055190	Putative glutathione-specific gamma-glutamylcyclotransferase 2
		Chr 4	cpo092950	Cytochrome P450 4d2
		Chr 5	cpo019100	Glutathione S-transferase 1
		Chr 5	cpo019630	Endocuticle structural glycoprotein ABD-4
		Chr 5	cpo020970	Cuticle protein 19
		Chr 5	cpo021030	Putative uncharacterized protein
		Chr 5	cpo021590	ATP-binding cassette sub-family D member 3
		Chr 5	cpo021830	Cytochrome P450 6B6
		Chr 5	cpo022240	Cytochrome P450 4C1
		Chr 5	cpo134070	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7
		Chr 6	cpo087230	Heparin sulfate O-sulfotransferase
		Chr 6	cpo149010	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 1
		Chr 8	cpo026510	Esterase FE4
		Chr 8	cpo026120	ATP-binding cassette sub-family A member 17
		Chr 8	cpo026090	Phospholipid-transporting ATPase ABCA1
		Chr 8	cpo023230	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 11
		Chr 9	cpo127410	Cuticle protein CP14.6
		Chr 10	cpo144790	Venom carboxylesterase-6
		Chr 10	cpo049610	ATP-binding cassette sub-family B member 6, mitochondrial
		Chr 10	cpo140170	Larval cuticle protein LCP-17
		Chr 10	cpo140190	Larval cuticle protein LCP-17
		Chr 11	cpo060030	NADPH--cytochrome P450 reductase
		Chr 11	cpo112920	ATP-binding cassette sub-family F member 3
		Chr 11	cpo113100	Alcohol dehydrogenase 1
		Chr 12	cpo130950	Cytochrome P450 9e2
		Chr 12	cpo130930	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 23 kDa subunit
		Chr 12	cpo085970	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial
		Chr 12	cpo085310	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial
		Chr 12	cpo085230	Pupal cuticle protein 20

Lignée	Réplica	Chr	Gene ID	Annotation
Deltaméthrine	R2	Chr 12	cpo151750	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 3A1
		Chr 12	cpo132710	Chorion peroxidase
		Chr 12	cpo122660	Putative uncharacterized protein
		Chr 13	cpo037220	Phospholipid-transporting ATPase ABCA1
		Chr 13	cpo037230	Phospholipid-transporting ATPase ABCA1
		Chr 13	cpo038120	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial
		Chr 14	cpo084830	Heat shock protein 68
		Chr 16	cpo090410	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
		Chr 17	cpo030310	Cytochrome P450 6k1
		Chr 18	cpo092400	Indole-3-acetaldehyde oxidase
		Chr 20	cpo041350	Pupal cuticle protein
		Chr 20	cpo044490	Phenoloxidase subunit 1
		Chr 21	cpo065240	Cytochrome P450 6B1
		Chr 22	cpo156860	Luciferin sulfotransferase
		Chr 22	cpo075930	Heat shock 70 kDa protein cognate 5
		Chr 22	cpo074980	Larval cuticle protein LCP-17
		Chr 23	cpo070080	Glucose-6-phosphate isomerase
		Chr 24	cpo058490	Heat shock protein 83
		Chr 26	cpo073220	Alpha-(1,3)-fucosyltransferase 4
		Chr 27	cpo098380	Putative uncharacterized protein
	Chr 28	cpo111920	Glucose-6-phosphate exchanger SLC37A2	
	Chr 28	cpo127980	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 2, mitochondrial	
	R3	Chr 1	cpo122460	Actin-1
		Chr 1	cpo115650	ATP-binding cassette sub-family F member 2
		Chr 1	cpo142780	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 23 kDa subunit
		Chr 1	cpo124940	Multidrug resistance protein homolog 49
		Chr 1	cpo124890	Multidrug resistance protein homolog 49
		Chr 1	cpo124910	Multidrug resistance protein homolog 49
		Chr 1	cpo148500	Multidrug resistance-associated protein 4

Lignée	Réplica	Chr	Gene ID	Annotation
Deltaméthrine	R3	Chr 1	cpo015440	Multidrug resistance-associated protein 4
		Chr 1	cpo014980	Carbohydrate sulfotransferase 3
		Chr 3	cpo054170	Ecdysone 20-monooxygenase
		Chr 3	cpo046950	ATP-binding cassette sub-family G member 1
		Chr 4	cpo159940	Cytochrome P450 4g15
		Chr 5	cpo134070	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7
		Chr 5	cpo022510	Cytochrome P450 4c3
		Chr 5	cpo021830	Cytochrome P450 6B6
		Chr 5	cpo021030	Putative uncharacterized protein
		Chr 5	cpo020970	Cuticle protein 19
		Chr 5	cpo020810	Cuticle protein 19
		Chr 5	cpo019630	Endocuticle structural glycoprotein ABD-4
		Chr 5	cpo019580	Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2
		Chr 5	cpo019530	Cuticle protein CP14.6
		Chr 6	cpo087230	Heparin sulfate O-sulfotransferase
		Chr 7	cpo143670	Short-chain dehydrogenase/reductase family 16C member 6
		Chr 8	cpo158880	Carbohydrate sulfotransferase 11
		Chr 8	cpo025090	Carbohydrate sulfotransferase 11
		Chr 9	cpo127410	Cuticle protein CP14.6
		Chr 10	cpo144790	Venom carboxylesterase-6
		Chr 11	cpo120170	Protein-tyrosine sulfotransferase
		Chr 11	cpo112920	ATP-binding cassette sub-family F member 3
		Chr 12	cpo151750	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 3A1
		Chr 12	cpo130950	Cytochrome P450 9e2
		Chr 13	cpo037220	Phospholipid-transporting ATPase ABCA1
		Chr 14	cpo084830	Heat shock protein 68
		Chr 15	cpo132230	Putative uncharacterized protein
		Chr 16	cpo090410	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
		Chr 17	cpo028930	Putative uncharacterized protein

Lignée	Réplica	Chr	Gene ID	Annotation
Deltaméthrine	R3	Chr 20	cpo041350	Pupal cuticle protein
		Chr 21	cpo062750	Cytochrome P450 6B2
		Chr 22	cpo156860	Luciferin sulfotransferase
		Chr 23	cpo070080	Glucose-6-phosphate isomerase
		Chr 23	cpo069780	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3
		Chr 27	cpo098380	Putative uncharacterized protein
		Chr 27	cpo098370	Pupal cuticle protein PCP52
		Chr 27	cpo162630	Pupal cuticle protein PCP52
		Chr 28	cpo111920	Glucose-6-phosphate exchanger SLC37A2

**Tableau 15 :** Gènes appartenant à la liste de gènes candidats ayant leur nombre de copies enrichi pour les lignées deltaméthrine

### iii. Spinosad

#### 1. Approche par filtrage de fréquences alléliques

Au total, 133 506 SNP ont passé les filtres pour la lignée Spinosad. Une représentation sous forme de Manhattan nous permet d'identifier les zones associées à la résistance à cette substance active. Comme pour les 2 substances actives précédentes aucun pic de différenciation clair n'est visible et la majorité des SNP ont une variation de fréquence allélique modéré : les 1% de SNP variant le plus ont un changement de fréquence de 21,6 points. (Figure 34)

Nous avons également cherché à localiser les zones porteuses d'une plus haute densité en SNP associés à la résistance grâce à un décompte des SNP dans des fenêtres de 50kb (Figure 35). Cela nous a permis de délimiter 445 fenêtres, formant au total 55 zones d'intérêt dans le génome. Nous observons un regroupement de 5 zones sur les chromosomes 3 et 5, 9, 11, 20 et 23. Ces zones sont porteuses de 5 gènes appartenant à la liste de gènes candidats, dont : une glucosamine 3-O-sulfotransferase (cpo060610), une glucose dehydrogenase (cpo118230), une NADH dehydrogenase (cpo141390), et deux ABC transporteurs (cpo136020, cpo136030). Les autres gènes identifiés sont eux impliqués dans leur majorité dans des activités catalytiques et des processus métaboliques. (Tableau 16)

#### 2. Approche par scan génomique

Pour les lignées ayant été sélectionnées avec du spinosad, 70 596 SNP de notre jeu de données faisaient partie du 1% des plus forts BF et 1929 d'entre eux ont eu un BF > 15 dans ce 1% supérieur.

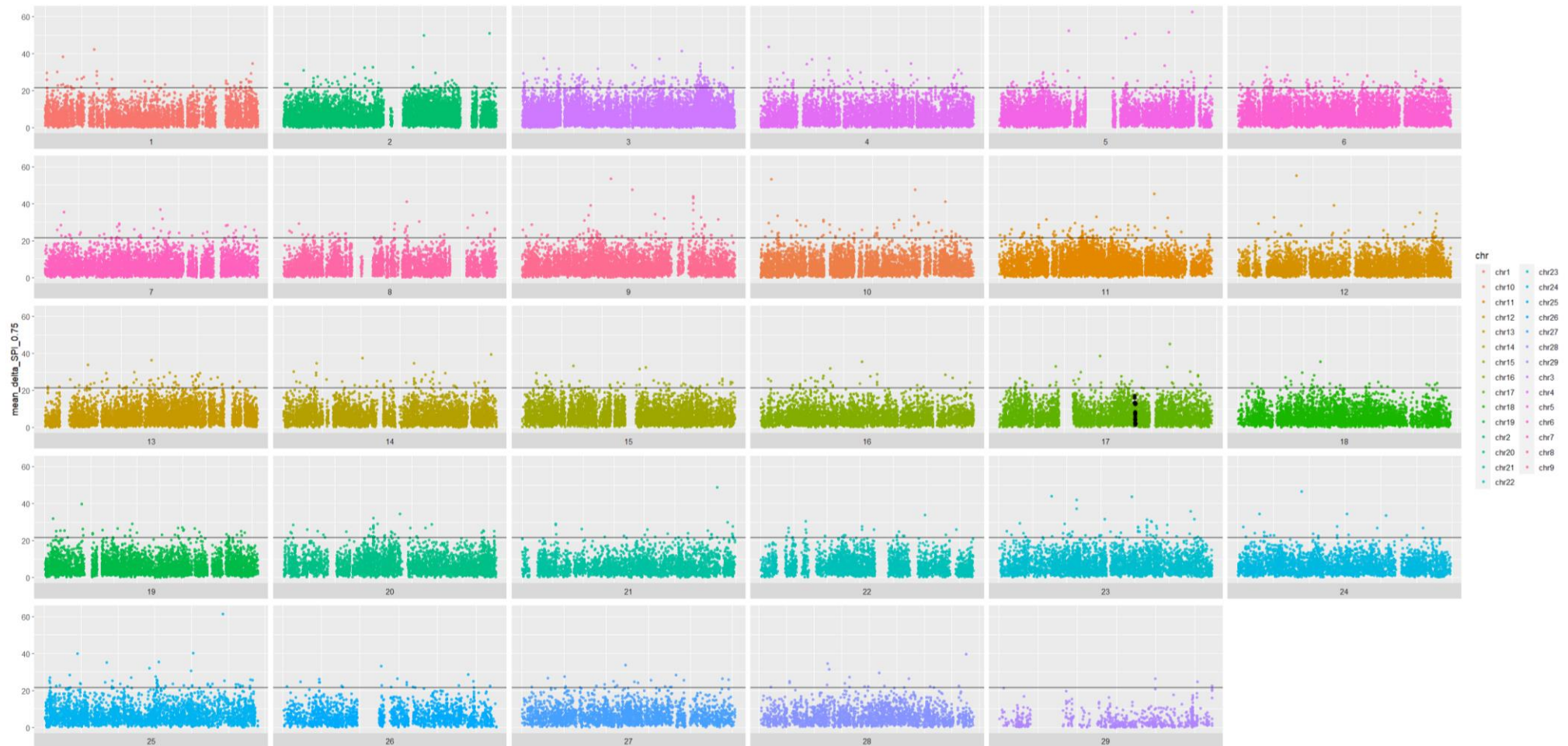
Comme précédemment, une représentation graphique du 1% supérieur des BF permet de visualiser quatre différents pics, situés dans les chromosomes 3 et 9. (Figure 36). Trois zones sont localisées sur le chromosome 3 dont une particulièrement dense en SNPs identifiés lors du scan génomique. Des pics de moindre hauteur sont visibles sur les chromosomes 4, 7, 9, 11, 12, 14, 15, 19 et 20. Si la même analyse est faite de façon plus stringente, en ne gardant que les SNPs ayant un BF > 15 (Figure 37), on distingue 22 zones ayant une densité d'au moins 3 SNP pour 50 kb : dans les chromosome 2, 3, 4, 5, 9, 10, 12, 16, 17, 20, 24, 25 et 27. On peut noter qu'une région sur le chromosome 3 a 8 SNP avec un BF > 15 et qu'une région sur le chromosome 9 a 4 SNP à un BF > 15.

Une analyse snpEff a ensuite été conduite sur Les SNPs sélectionnés ayant un BF > 15. 34 SNP sont identifiés comme des mutations non-synonymes (dont 4 font gagner un codon stop), 15 sont des variants synonymes. Concernant leur localisation : 495 se trouvent dans la zone en amont de gènes (jusqu'à 5kb de l'extrémité 5'), 175 se trouvent dans la zone en aval de gènes (jusqu'à 5kb de l'extrémité 3'), 1268 correspondant à des variant dans les zones intergéniques. (Tableau 20)

Au total, 373 gènes annotés ont été identifiés dans les zones dans lesquelles la densité de ces SNP est plus importante, parmi lesquels 40 SNP se trouvent dans des gènes issus de la liste de candidats. On peut remarquer : un cytochrome P450 301a1 (cpo116260), 6 ABC transporteurs (cpo144960, cpo046950, cpo136030, MSTRG.20978, MSTRG.14952), une protéine cuticulaire (cpo021020), une NADPH-cytochrome P450 reductase (cpo060030) et une UDP-glucosyltransferase (cpo053710), ainsi que des protéines identifiées comme impliquées dans le métabolisme énergétique. (Tableau 17)

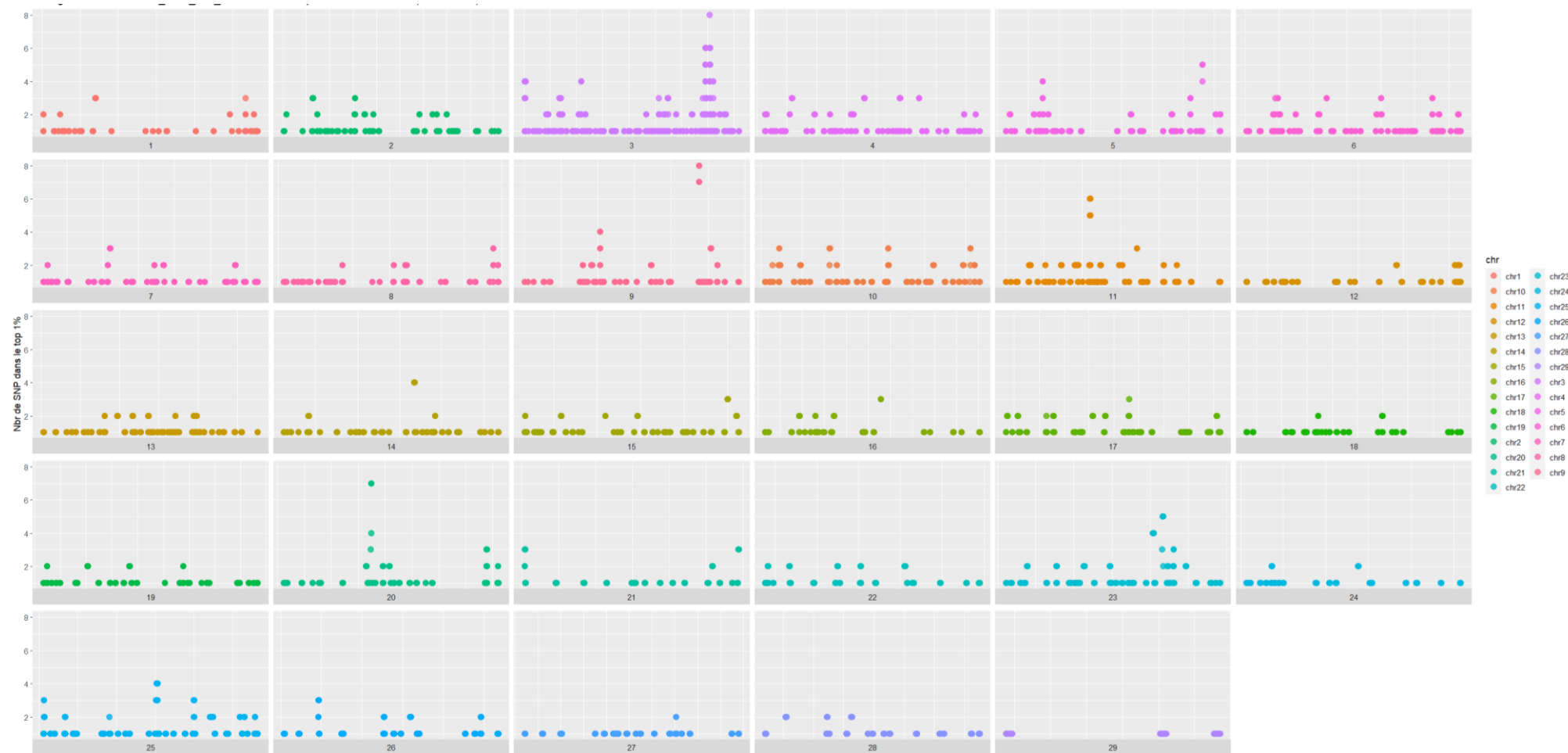
### 3. Détection de variations du nombre de copies de gènes

La recherche d'amplification génique nous a permis d'identifier 313 gènes ayant un nombre de copies enrichi. Parmi ces gènes on en retrouve 7 présents dans la liste de candidats (Tableau 18), dont 2 cytochromes P450 : CYP4C1 (cpo063300) et CYP6a2 (cpo157460) étant enrichi dans les répliques 1 et 2, respectivement. Aucun des gènes candidats ne se retrouve dans plusieurs répliques.



**Figure 34 :** Manhattan plot représentant Les SNPs ayant passé les différents filtres de fréquences, selon leur variation entre les conditions C et HD, pour les lignées spinosad. Les SNPs présents au-dessus de la ligne noire font partie des 1% les plus variés. La zone noire sur le chromosome 17 correspond au gène « voltage-gated sodium channel» où se trouve la mutation *kdr*.





**Figure 35 :** Manhattan plot des SNP ayant passé les différents filtres de fréquences pour les lignées spinosad, en fenêtres glissantes de 50kb, selon le nombre de SNP présents au sein des 1% les plus variés



**Figure 36 :** Manhattan plot représentant Les SNPs faisant partie des 1% qui ont les BF les plus élevés, pour les lignées spinosad



**Figure 37 :** Manhattan plot représentant le nombre de SNP ayant des BF > 15, en fenêtres glissantes de 50kb, pour les lignées spinosad

Lignée	Gene ID	Annotation	Gène candidat
Spinosad	cpo058300	Putative uncharacterized protein	CP.11g304170.m01
	cpo058310	Zinc finger Y-chromosomal protein 1	
	cpo058700	Transcription factor Sp9	
	cpo060610	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 5	
	cpo062720	Putative uncharacterized protein	
	cpo063600	LINE-1 reverse transcriptase homolog	
	cpo063980	Lactase-phlorizin hydrolase	
	cpo063990	Soluble guanylate cyclase 88E	
	cpo064300	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 12	
	cpo065700	Putative uncharacterized protein	
	cpo065710	Insulin-like growth factor 1 receptor	
	cpo068800	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	
	cpo068810	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	
	cpo068820	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	
	cpo068830	Trafficking protein particle complex subunit 12	
	cpo068840	Histone-arginine methyltransferase CARMER	
	cpo068850	ATP-dependent RNA helicase DDX24	
	cpo083620	Probable RNA-directed DNA polymerase from transposon BS	
	cpo083630	Phospholipase A1 member A	
	cpo083640	Lipase member H	
	cpo083660	Phospholipase A1 member A	
	cpo087070	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2	
	cpo087080	ATP-dependent DNA helicase pif1	
	cpo087830	Integrin beta pat-3	
	cpo087840	Integrin beta pat-3	
	cpo087850	Integrin beta pat-3	
	cpo090930	Aminoacylase-1	
	cpo091610	Putative uncharacterized protein	
	cpo091820	Putative uncharacterized protein	
	cpo091830	Dopamine N-acetyltransferase	
	cpo091840	Putative uncharacterized protein	
	cpo094030	Suppressor of lurcher protein 1	
	cpo094040	DNA ligase 3	
	cpo095280	Beta-alanine-activating enzyme	
	cpo095290	Protein kinase C-binding protein NELL1	
	cpo096180	Putative uncharacterized protein	
	cpo101010	Transposable element Tc1 transposase	
	cpo101020	Nibrin	
	cpo101030	Ribosomal L1 domain-containing protein CG13096	
	cpo101040	Intraflagellar transport protein 140 homolog	
cpo101050	Intraflagellar transport protein 140 homolog		
cpo101060	Intraflagellar transport protein 140 homolog		

Lignée	Gene ID	Annotation	Gène candidat
Spinosad	cpo101070	Translation factor GUF1 homolog, mitochondrial	CP.10g274510.m01
	cpo101080	Translation factor GUF1 homolog, mitochondrial	
	cpo101090	Translation factor GUF1 homolog, mitochondrial	
	cpo101100	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3	
	cpo101120	Ragulator complex protein LAMTOR2 homolog	
	cpo101130	Protein SDA1 homolog	
	cpo101140	ER lumen protein-retaining receptor	
	cpo101150	Putative uncharacterized protein	
	cpo101160	Putative uncharacterized protein	
	cpo103140	Glutamate-gated chloride channel	
	cpo103990	Fatty acid synthase	
	cpo104000	Fatty acid synthase	
	cpo104010	Fatty acid synthase	
	cpo109360	Carnitine O-acetyltransferase	
	cpo109370	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, rhodopsin-specific isozyme	
	cpo109380	CD109 antigen	
	cpo109390	Tensin homolog	
	cpo110460	Transposon Tf2-12 polyprotein	
	cpo112490	Zinc finger Y-chromosomal protein	
	cpo112500	Uncharacterized protein C1orf198 homolog	
	cpo112510	Enhancer of rudimentary homolog	
	cpo112520	Breast cancer type 2 susceptibility protein homolog	
	cpo112530	Putative uncharacterized protein	
	cpo112540	Glycogen [starch] synthase	
	cpo118220	Ras-related protein M-Ras	
	cpo118230	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	
	cpo118240	Putative uncharacterized protein	
	cpo118250	Glucose dehydrogenase [FAD, quinone]	
	cpo120270	Peroxidasin	
	cpo121730	FGGY carbohydrate kinase domain-containing protein	
	cpo121740	Serine/threonine-protein phosphatase rdgC	
	cpo121750	Putative uncharacterized protein	
	cpo122160	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1	
	cpo122170	Probable RNA-directed DNA polymerase from transposon X-element	
	cpo122180	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 61F	
	cpo124370	2-(R)-hydroxypropyl-CoM dehydrogenase	
	cpo124380	Protein turtle	
	cpo124390	Putative uncharacterized protein	
	cpo130260	Zinc finger MIZ domain-containing protein 1	
	cpo131540	Calcium-binding protein E63-1	
cpo131550	Trypsin II-P29		
cpo131560	Cytoplasmic phosphatidylinositol transfer protein 1		
cpo131570	Trafficking protein particle complex subunit 13		

Lignée	Gene ID	Annotation	Gène candidat
Spinosad	cpo131580	Derlin-2	
	cpo136020	ATP-binding cassette sub-family G member 4	CP.03g072770.m01-00001
	cpo136030	ATP-binding cassette sub-family G member 1	CP.03g072770.m01-00003
	cpo136040	Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR	
	cpo136050	Transmembrane protein 62	
	cpo136060	Protein expanded	
	cpo136070	Broad-complex core protein isoforms 1/2/3/4/5	
	cpo136080	Mariner Mos1 transposase	
	cpo136090	Broad-complex core protein isoforms 1/2/3/4/5	
	cpo136100	Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon opus	
	cpo136110	Nuclear receptor subfamily 2 group E member 1	
	cpo136210	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2-like	
	cpo136220	Nucleic-acid-binding protein from transposon X-element	
	cpo136230	Retinol dehydrogenase 11	
	cpo136240	Putative uncharacterized protein	
	cpo136250	Retinol dehydrogenase 13	
	cpo137660	Transposable element Tcb2 transposase	
	cpo138460	Dedicator of cytokinesis protein 1	
	cpo138470	Putative uncharacterized protein	
	cpo138480	Dedicator of cytokinesis protein 1	
	cpo138490	Dedicator of cytokinesis protein 5	
	cpo138500	Dedicator of cytokinesis protein 1	
	cpo138510	Putative uncharacterized protein	
	cpo138520	Dedicator of cytokinesis protein 1	
	cpo138530	Dedicator of cytokinesis protein 2	
	cpo138790	Protein kinase C and casein kinase II substrate protein 3	
	cpo139840	Protein Skeletor, isoforms B/C	
	cpo139850	THO complex subunit 3	
	cpo141390	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial	CP.04g129240.m01
	cpo141400	Synembryn	
	cpo141410	Spondin-1	
	cpo141420	Zinc transporter 1	
	cpo142150	Protein hu-li tai shao	
	cpo144090	Putative uncharacterized protein	
cpo144100	Mitochondrial uncoupling protein 4		
cpo150270	Inositol polyphosphate multikinase		
cpo150280	AN1-type zinc finger protein 4		
cpo150290	AN1-type zinc finger protein 4		
cpo150300	40S ribosomal protein S26		
cpo153270	RNA-directed DNA polymerase from mobile element jockey		

**Tableau 16 :** Gènes pour lesquels un SNP a passé les filtres de fréquence alléliques et l'indication du gène candidat associé, pour les lignées spinosad

Chr	position	Gene ID	Transcript ID	Gène candidat	Annotation
chr21	15099545		MSTRG.14952.5	CP.21g532410.m01-00002	ABC transporter G family member 23
chr9	9298869		MSTRG.28161.2	CP.09g255280.m01	Acetylcholinesterase
chr9	9298998		MSTRG.28161.2	CP.09g255280.m01	Acetylcholinesterase
chr12	25897413	cpo125640		CP.12g340470.m01-00002	Actin, cytoplasmic A3a
chr18	313530		MSTRG.10112.1	CP.18g460950.m01	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase
chr24	14499432	cpo144960		CP.24g578140.m01-00001	ATP-binding cassette sub-family D member
chr3	11144005	cpo046950		CP.03g081470.m01	ATP-binding cassette sub-family G member 1
chr3	286373	cpo136030		CP.03g072770.m01-00004	ATP-binding cassette sub-family G member 1
chr3	23549460		MSTRG.20978.3	CP.03g092570.m01	ATP-binding cassette sub-family G member 4
chr3	23550103		MSTRG.20978.3	CP.03g092570.m01	ATP-binding cassette sub-family G member 4
chr4	14305614	cpo122000		CP.04g120470.m01	Bile salt-activated lipase
chr26	2259807		MSTRG.17807.1	CP.26g594710.m01	Catenin alpha
chr5	11098105	cpo021020		CP.05g153190.m01	Cuticle protein 19
chr10	10364146		MSTRG.2321.3	CP.10g279860.m01	Glutathione hydrolase 1 proenzyme
chr10	10400197		MSTRG.2321.4	CP.10g279860.m01	Glutathione hydrolase 1 proenzyme
chr23	5974996	cpo070050		CP.23g558250.m01-00004	Glutathione synthetase
chr23	5977012	cpo070050		CP.23g558250.m01-00004	Glutathione synthetase
chr23	5891266	cpo070030		CP.23g558180.m01	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 10, mitochondrial
chr11	13134196	cpo060030		CP.11g306030.m01	NADPH--cytochrome P450 reductase
chr11	13142538	cpo060030		CP.11g306030.m01	NADPH--cytochrome P450 reductase
chr2	27072595		MSTRG.12810.3	CP.02g057640.m01	Peroxidase
chr2	27105606		MSTRG.12810.3	CP.02g057640.m01	Peroxidase
chr2	34964466	cpo005960		CP.02g065050.m01	Peroxidase
chr2	34964506	cpo005960		CP.02g065050.m01	Peroxidase

Chr	position	Gene ID	Transcript ID	Gène candidat	Annotation
chr13	25058985	cpo116260		CP.13g369270.m01	Probable cytochrome P450 301a1, mitochondrial
chr13	25059620	cpo116260		CP.13g369270.m01	Probable cytochrome P450 301a1, mitochondrial
chr13	5607535		MSTRG.5308.4	CP.13g349830.m01	Putative oxidoreductase GLYR1 homolog
chr3	34641927	cpo054760		CP.03g102780.m01	Putative uncharacterized protein
chr3	34641954	cpo054760		CP.03g102780.m01	Putative uncharacterized protein
chr3	34668234	cpo054760		CP.03g102780.m01	Putative uncharacterized protein
chr5	7901377		MSTRG.23329.63	CP.05g150590.m01	Putative uncharacterized protein
chr5	9066148		MSTRG.23382.2	CP.05g151570.m01	Putative uncharacterized protein
chr5	9084587		MSTRG.23382.2	CP.05g151570.m01	Putative uncharacterized protein
chr5	9106505		MSTRG.23382.2	CP.05g151570.m01	Putative uncharacterized protein
chr14	16679194		MSTRG.6861.1	CP.14g386390.m01	RAB11-binding protein RELCH
chr8	13302723		MSTRG.27165.1	CP.08g233620.m01	Sodium channel protein 60E
chr3	31791145	cpo053710		CP.03g100030.m01a-00001	UDP-glucosyltransferase 2
chr8	21923857		MSTRG.27572.1	CP.08g241670.m01	Venom carboxylesterase-6
chr11	3801908			CP.11g298700.m01	Pas d'annotation dans le génome de référence
chr3	297797			CP.03g072770.m01-00004	Pas d'annotation dans le génome de référence

**Tableau 17 :** SNPs identifiés suite au scan génomique, localisés dans des gènes appartenant à notre liste de gènes candidats (avec correspondance avec les identifiants du génome ou de notre transcriptome) pour les lignées spinosad



Lignée	Réplica	Chr	Gene ID	Annotation
SPI	R1	Chr 10	cpo144780	Venom carboxylesterase-6
		Chr 21	cpo063300	Cytochrome P450 4C1
		Chr 23	cpo069780	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3
	R2	Chr 4	cpo103190	Juvenile hormone esterase
		Chr 5	cpo022390	Cuticle protein 19.8
		Chr 9	cpo157460	Cytochrome P450 6a2
	R3	Chr 5	cpo159310	Putative uncharacterized protein

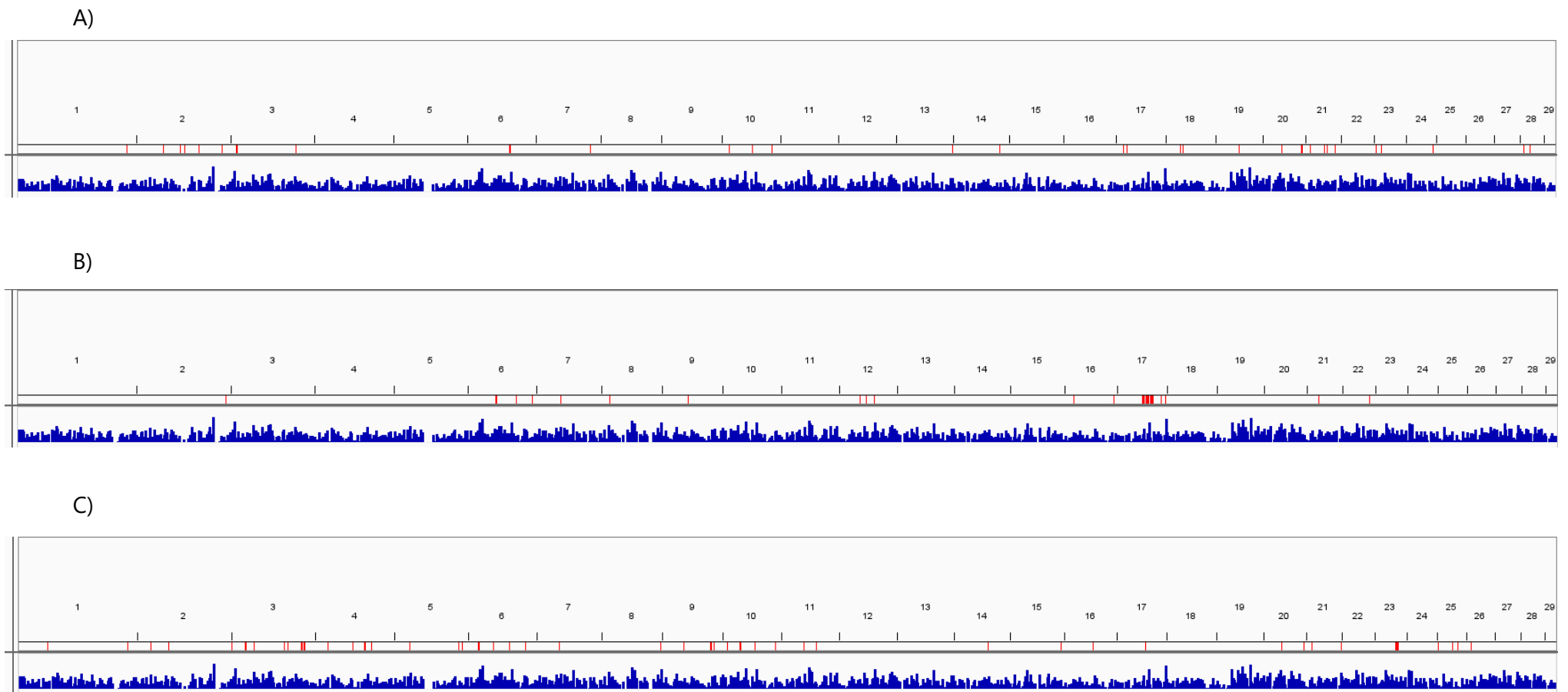
**Tableau 18 :** Gènes appartenant à la liste de gènes candidats ayant leur nombre de copies enrichi pour les lignées spinosad

iv. Gènes en commun entre substances actives et entre analyses

En ce qui concerne l'approche de filtrage de fréquences alléliques, nous n'avons pas trouvé de gènes candidats en commun entre les différentes lignées. Pour l'approche de scan génomique, aucun gènes candidats communs aux 3 lignées n'a été détecté non plus.

Mais deux gènes candidats se retrouvent à la fois dans deux des lignées. Une UDP-glucosyltransferase 2 (cpo053710) a été détectée dans les lignées deltaméthrine et spinosad. Une estérase FE4 (cpo026490) a quand elle été identifiées en parallèle dans les lignées chlorantraniliprole et deltaméthrine (Tableau 20). En ce qui concerne l'approche de nombre de copies de gènes, on retrouve des gènes en commun uniquement entre les lignées chlorantraniliprole et deltaméthrine, dont plusieurs gènes impliqués dans la constitution de l'endocuticule (dont 2 se retrouvent dans 2 répliques chlorantraniliprole et un réplica deltaméthrine : cpo019630, cpo019580), de la cuticule et deux carbohydate sulfotransferases. Tous ces gènes liés à l'endocuticule se trouvent dans une fenêtre de 200 kb située sur le chromosome 5 (Tableau 22).

On peut également remarquer que des gènes issus de notre liste de gènes candidats ressortent en commun dans nos différentes analyses. En effet, on retrouve une ATP-binding cassette (cpo136030) dans les analyses de fréquence allélique et de scan génomique dans les lignées spinosad. On retrouve également un CYP6a17 dans nos analyses de fréquences alléliques dans les lignées chlorantraniliprole et dans l'analyse de scan génomique de nos lignées deltaméthrine. Enfin, on retrouve une ATP-binding cassette (cpo136020) dans nos analyses de fréquences alléliques de nos lignées spinosad et dans l'analyse de CNV des lignées chlorantraniliprole.



**Figure 38 :** Représentation des zones d'intérêt (lignes rouges) suite à l'analyse par filtrages de fréquences alléliques sur le génome de *C. pomonella*, pour les lignées chlorantraniliprole (A), deltaméthrine (B) et spinosad (C). La représentation s'est faite via le logiciel IGV.

Lignée	Chr	position	Gene ID	Transcript ID	Gène candidat	Annotation
CHL + SPI	chr2	32321188	cpo005550		Non	Serine/threonine-protein kinase Doa
CHL + SPI	chr12	26873168	cpo125950		Non	Regulatory-associated protein of mTOR
CHL + SPI	chr25	6227985		MSTRG.17441.2	Non	
DEL + SPI	chr28	6291118			Non	
CHL + SPI	chr12	6870117		MSTRG.4203.3	Non	Developmentally-regulated GTP-binding protein 2
CHL + SPI	chr3	10834390			Non	
CHL + SPI	chr20	13995825		MSTRG.14022.1	Non	Leucine-zipper-like transcriptional regulator 1
CHL + SPI	chr4	15355282			Non	
DEL + SPI	chr10	22222013			Non	

**Tableau 19 :** SNPs identifiés après scan génomique présents dans différentes lignées à la fois

Lignées	Gene ID	Annotation
CHL + DEL	cpo026490	Esterase FE4
DEL + SPI	cpo053710	UDP-glucosyltransferase 2

**Tableau 20 :** Gènes candidats dans les lesquels un SNP a été identifié suite aux scans génomiques, présents dans différentes lignées à la fois (CHL : lignées chlorantraniliprole, DEL : lignées deltaméthrine, SPI : lignées spinosad)

Insecticide	Chlorantraniliprole	Deltamethrine	Spinosad
Nombre total de SNP	1330		
Variants synonymes	11	17	15
Variants non-synonymes	23	28	21
Variants en amont du gène	319	418	495
Variants en aval du gène	114	155	175
Variants dans des régions intergéniques	892	1102	1268

**Tableau 21** : Nombre, impact et localisation des SNPs identifiés suite au scans génomiques dans les différentes lignées

Réplica Chlorantraniliprole	Réplica Deltaméthrine	Chr	Gene ID	Annotation
CHL R2	DEL R2	Chr 5	cpo021590	ATP-binding cassette sub-family D member 3
CHL R3	DEL R3	Chr 5	cpo019530	Cuticle protein CP14.6
CHL R1 + CHL R2	DEL R2	Chr 5	cpo019630	Endocuticle structural glycoprotein ABD-4
CHL R1 + CHL R2	DEL R3	Chr 5	cpo019580	Endocuticle structural glycoprotein SgAbd-2
CHL R2	DEL R3	Chr 5	cpo019630	Endocuticle structural glycoprotein ABD-4
CHL R2	DEL R3	Chr 8	cpo025090	Carbohydrate sulfotransferase 11
CHL R2	DEL R3	Chr 8	cpo158880	Carbohydrate sulfotransferase 11
CHL R2	DEL R2	Chr 12	cpo085310	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial
CHL R2	DEL R2	Chr 12	cpo085230	Pupal cuticle protein 20
CHL R2	DEL R2	Chr 22	cpo074980	Larval cuticle protein LCP-17
CHL R3	DEL R3	Chr 27	cpo098370	Pupal cuticle protein PCP52

**Tableau 22** : Gènes ayant vu leur nombre de copies enrichi présents au sein de répliques de plusieurs lignées

## V. Discussion

La combinaison des différentes analyses entre elles a permis d'identifier de nombreuses régions génomiques et de nombreux gènes associés à la résistance. Notre hypothèse de départ était que le phénotype résistant à différentes substances actives de la population initiale serait dû à une résistance croisée, comme il a déjà été montré à plusieurs reprises chez *C. pomonella* (Reyes et al., 2009; Wan et al., 2019). Mais les résultats de cette étude penchent plutôt vers une résistance multiple aux différentes substances actives par accumulation de divers gènes et mécanismes. En effet, on peut voir que très peu de gènes associés aux résistances sont communs aux différentes lignées soumises à des pressions de sélection avec des substances actives différentes. Deux enzymes de détoxification sont communes à deux lignées : une UDP-glucosyltransferase 2 et une estérase FE4. La famille des UDP-glucuronosyltransférases (UGT), associée à la résistance à la deltaméthrine et au spinosad dans notre étude, a déjà été décrite comme impliquée dans la résistance au chlorantraniliprole chez *P. xylostella* (X. Li et al., 2017), aux pyréthrinoïdes chez *Spodoptera litura* (Xu et al., 2020) et au spinosynés chez *P. xylostella* (Agrawal et al., 2022). Les UGT sont cependant relativement peu décrites chez les insectes, même si elles sont connues pour être impliquées dans un grand nombre de fonctions physiologiques et commencent à être identifiées dans des résistances à de nombreuses substances actives (Ahn et al., 2012), questionnant leur importance et la force de leur effet dans les phénotypes résistants.

L'estérase FE4 est quant à elle déjà connue pour être impliquée dans des résistances. Notamment chez le puceron *M. persicae*, où elle est responsable par amplification génique de la résistance à de nombreuses substances actives insecticides (Field et al., 1999).

L'implication des phénomènes de duplication a déjà été montré dans de nombreux cas de résistance aux pyréthrinoïdes (Bass & Field, 2011; Devonshire & Field, 1991; Faucon et al., 2017), mais seulement suggéré dans le cas de la résistance au spinosad (Agrawal et al., 2022), voire pas du tout évoqué pour la résistance au chlorantraniliprole. Dans nos analyses, nous retrouvons cette hiérarchisation. Une plus grande proportion de gènes voit leur nombre de copies augmenter dans la lignée deltaméthrine (127 gènes dans nos 3 répliques), un nombre moyen dans les lignées chlorantraniliprole (37 gènes) et peu dans les lignées spinosad (7 gènes seulement).

À travers nos différentes analyses, de nombreuses signatures de sélection ont pu être identifiées, et confirment notamment le rôle important des CYP et des mécanismes d'efflux (ABC transporteurs et *multidrug resistance proteins*, MDR) dans les résistances aux insecticides. En effet, on retrouve des SNP associés aux résistances au sein de gènes de ces familles dans les trois différentes lignées sélectionnées.

En ce qui concerne les CYP présents dans nos résultats, on peut remarquer leur appartenance aux clans 4 et 6, dans toutes les lignées. Ces deux clans ont déjà été montrés comme impliqués dans des mécanismes de réponse aux xénobiotiques et plus particulièrement dans la résistance aux insecticides pour le clan 6 (Amezian et al., 2021; Daborn et al., 2007; Heckel, 2012; Li et al., 2007). L'implication de ces enzymes de détoxification est particulièrement marquée dans les sous-lignées deltaméthrine où 13 gènes de CYP, appartenant aux clans 4 et 6, ont vu leur nombre de copie augmenter ou portent des SNP associés à la résistance.

Même s'elles sont peu connues et peu étudiées chez les insectes (Akbar et al., 2014; Gott et al., 2017), les protéines impliquées dans les mécanismes d'efflux semblent avoir un rôle non négligeable dans la résistance de *C. pomonella* aux insecticides. Des ABC transporteurs ont été décrits comme étant impliqués dans la résistance au chlorantraniliprole chez plusieurs espèces d'insectes (Peng et al., 2021; Shan et al., 2021), ainsi que dans la résistance à la deltaméthrine chez *C. pomonella* (Dai et al., 2022). Les protéines MDR ont également été montrées comme participant à la résistance aux pyréthriinoïdes chez *D. melanogaster* et *A. gambiae* (Pignatelli et al., 2018; Seong et al., 2016).

On remarque que des protéines de transport et également impliquées dans le métabolisme intermédiaire et secondaire (ABC transporteurs, UDP glucuronosyltransférases, NADH déshydrogénases) sont présentes. Cette étude met en avant également des gènes impliqués dans la formation de la cuticule des insectes (au stade larvaire et nymphal). Le rôle de cette barrière physique dans la modulation de la pénétration des substances actives insecticides a largement été décrite chez les insectes (Balabanidou et al., 2018) et plus particulièrement chez une espèce de moustique (Bonizzoni et al., 2015) et son rôle dans la résistance aux insecticides chez *C. pomonella* a également déjà été suggéré dans plusieurs études (Dai et al., 2022; Wan et al., 2019).

Enfin, comme dans nos analyses transcriptomiques, on remarque que 4 gènes ressortent conjointement des analyses de scan génomique dans nos lignées chlorantraniliprole et spinosad : une protéine kinase Doa (cpo005550), une régulatrice mTOR (cpo125950), une GTP-binding protein et une protéine régulatrice de type glissière à leucine. Pour ces deux dernières, l'annotation du génome ne donne pas de numéro d'identification de gène, mais correspond à deux transcrits dont nous avons identifié les bornes lors de nos analyses transcriptomiques (MSTRG.4203 et MSTRG.14022, respectivement). Ces protéines sont toutes les quatre impliquées dans des mécanismes de développement cellulaire, sans avoir été associées à des mécanismes de résistance.

Aucune étude n'avait été effectuée à ce jour sur la variation des CNV associés à la résistance aux insecticides chez *C. pomonella*. Les résultats de nos analyses mettent en lumière 2 zones particulièrement enrichies. Pour la lignée chlorantraniliprole : toute une fenêtre de 200 kb située sur le chromosome 5 englobant deux gènes codant pour des paralogues de glycoprotéines structurant l'endocuticule. Dans la littérature, ces protéines ne sont pas connues pour être directement impliquées dans des résistances, mais font partie du processus de formation de cette barrière physique. La seconde zone génomique impliquée dans la résistance à la deltaméthrine via une augmentation des CNV est porteuse de 8 protéines de type MDR. Elle s'étend sur une zone de 40kb et est située sur le chromosome 1. Le lien entre l'amplification génique de ces protéines et la résistance aux insecticides reste cependant encore largement inconnu, notamment chez les Lépidoptères.

On peut également remarquer une dichotomie entre les lignées deltaméthrine et les deux autres lignées. En effet, on retrouve beaucoup plus de gènes dans les analyses des lignées deltaméthrine que pour les deux autres lignées, plus particulièrement au niveau des analyses de nombre de copies (CNV). Cela pourrait s'expliquer par le fait que cette lignée a subi une génération sous sélection de plus que les autres (le nombre de générations étant un paramètre ayant une grande influence dans les résultats d'une expérimentation d'évolution et reséquençage). L'autre particularité de cette lignée c'est qu'elle est porteuse d'une mutation de cible bien connue : *kdr* sur le chromosome 17. Nos analyses montrent qu'une grande partie des SNP (16,4 %) ont été « tirés » sans doute à cause d'un phénomène autostop génique (Smith & Haigh, 1974) dans nos analyses. En effet, les mutations de cible peuvent masquer les autres mutations causales des résistances, étant considérées comme des gènes à effet fort (Roush &



Tabashnik, 1990). Cela pourrait également être lié au phénotype de notre population initiale, qui avait un niveau de résistance plus élevé à la deltaméthrine qu'au deux autres substances actives.

Nous pouvons également remarquer que les approches liées à la détection de SNP associés aux résistances n'ont pas de résultats concordants. Cela peut être dû à la stringence de nos analyses : en effet, l'approche de filtrage de fréquences alléliques est moins robuste que celle de scan génomique. Cela peut venir des seuils et des conditions que nous avons posées pour retenir les SNP, notamment dans le cas d'une diminution sans pression de sélection, alors que ce cas de figure n'est présent que pour si mutations ont un coût à la résistance (Belinato et al., 2016).

Nos différentes analyses et le croisement de leurs résultats nous permettent ainsi d'associer de façon robuste à la résistance différents marqueurs et gènes identifiés dans nos résultats. Cependant, une étape de validation fonctionnelle reste nécessaire pour pouvoir affirmer qu'il existe un lien de causalité entre les gènes identifiés et le phénotype de résistance aux insecticides. Nous avons centré nos analyses sur les gènes mais le rôle d'autres types de variants pourraient être approfondi, notamment affiner le rôle des SNP des régions *trans* ou *cis* régulatrices de gènes. Ces dernières pourraient être identifiées grâce au croisement d'analyses d'expression de gènes et de polymorphisme, en dehors des régions exoniques.

Nos résultats apportent un éclairage nouveau, grâce à une approche sans à priori balayant tout le génome, des mécanismes associés à la résistance aux insecticides, avec la découverte de nouveaux gènes et marqueurs chez *C. pomonella*. En plus de l'apport de connaissance, ces marqueurs pourront être utilisés dans un outil de détection moléculaire pour de détecter à plus grande échelle la résistance au chlorantraniliprole, à la deltaméthrine et au spinosad et également d'identifier si des résistances métaboliques sont à l'œuvre dans les phénotypes des populations résistantes observées.

# Discussion générale

## I. Rappel du contexte

À l'heure actuelle, notre société fait face à de nombreux défis environnementaux, notamment en lien avec l'agriculture. Avec le besoin d'une production agricole toujours plus efficace, l'utilisation d'intrants a été un des leviers les plus importants pour arriver à cet objectif, via notamment l'utilisation de pesticides afin de contrôler les populations de ravageurs de cultures. En effet, depuis la seconde moitié du XX<sup>e</sup> siècle, des insecticides chimiques ont été utilisés de façon massive, afin de contrôler efficacement les ravageurs de culture et augmenter de façon significative les rendements agricoles. Cependant, l'efficacité de ces insecticides s'est rapidement amenuisée avec le développement de résistances dans les populations de ravageurs, et ces cas de résistances n'ont cessé d'augmenter suite à une utilisation intensive et répétée de ces produits (Sparks & Nauen, 2015). De plus, la demande sociale pour une agriculture plus respectueuse de l'environnement (en gardant une production agricole efficace), couplée à l'évolution de résistances aux pesticides de plus en plus nombreuses, amènent à repenser les conduites agricoles actuelles. Dans ce contexte, la détection et la quantification des résistances chez les ravageurs devient un enjeu majeur aussi bien pour réduire et optimiser la durabilité des substances actives d'intérêt que pour évoluer vers une agriculture nécessitant le moins d'intrants possible.

Au cours de cette thèse je me suis intéressée à un ravageur emblématique en arboriculture : le carpocapse des pommes, *Cydia pomonella*. Il est le principal ravageur de pommiers dans le monde, provoquant des milliards de dollars de dégâts, pouvant impacter 80% des récoltes sans traitement et concentre 2/3 des traitements insecticides réalisés en vergers en France. Depuis les années 1980 des résistances à de nombreuses familles d'insecticides ont été identifiées en Amérique et dans toute l'Europe. Il apparaît donc primordial de gérer ces résistances pour pouvoir garantir l'efficacité de insecticides disponibles sur le marché. Ces résistances peuvent être causées par différents mécanismes :

- Des résistances liées à la cible moléculaire de l'insecticide (RLC), liées le plus souvent à des modifications de protéines via des mutations ponctuelles

- Des résistances non liées à la cible (RNLC). Les déterminants génétiques causant ces dernières sont moins connus chez *C. pomonella*.

Dans ce contexte, ce travail s'intéresse à caractériser les bases génétiques des résistances du carpocapse des pommes à différents insecticides et bio-insecticides, dans le but d'identifier des marqueurs associés à ces résistances, à travers la mise en place d'une expérimentation de type « evolve and resequence » menée avec 3 substances actives (chlorantraniliprole, deltaméthrine et spinosad) sur une population de terrain caractérisée comme résistante à plusieurs substances actives.

## II. Utilisation d'une expérimentation d'évolution et reséquençage dans la recherche de résistances

### a. Synthèse des méthodes et résultats

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en place toute la manipulation (Chapitre 1). J'ai développé une nouvelle méthode d'élevage en laboratoire permettant l'acclimatation et l'agrandissement de la taille de la population. Ensuite, j'ai mis en place un protocole pour appliquer une pression de sélection calibrée sur la population résistante et ainsi créer des lignées de laboratoire divergentes, où les allèles associés à la résistance ont été ségrégués selon la substance active utilisée lors de la sélection. La nouvelle méthode d'élevage a été un succès et nous a permis d'augmenter le taux de reproduction de 3,4 fois. Ce protocole d'acclimatation et de multiplication est maintenant utilisé en routine au laboratoire pour élever efficacement des populations de carpocapse échantillonnées sur le terrain.

Trois insecticides utilisés contre *C. pomonella* ont été sélectionnés selon les critères suivants : la résistance de la population initiale, leur utilisation en agriculture et la fréquence d'individus résistants en France. Le choix s'est ainsi porté sur le chlorantraniliprole, la deltaméthrine et le spinosad.

J'ai ainsi pu faire évoluer 3 lignées différentes, sélectionnées chacune sur une substance active. Trois répétitions par lignées ont été réalisées. Chacune de ces répétitions ont été subdivisées en sous-lignées à la dernière génération en les soumettant à des traitements insecticides différents : une concentration nulle sans pression de sélection (sous-lignées Control), une

concentration intermédiaire correspondant à une pression de sélection moyenne (sous-lignées MD) ou une sélection forte (sous-lignées HD). Ceci a été fait dans le but de créer des contrastes dans les fréquences alléliques des allèles associés aux résistances aux différentes substances actives.

Différentes méthodes de phénotypage ont été utilisées pour caractériser les lignées et sous-lignées, via des bioessais par ingestion et des dosages enzymatiques. Les rapports de résistances observés sont faibles. Ceci s'explique par le fait que nous ayons croisé la population résistante avec la souche sensible de laboratoire et que 5 générations sans pression de sélection ont été nécessaires à l'acclimatation et l'augmentation du nombre d'individus dans la population. Nous avons également fait le choix de ne pas exercer de pression de sélection trop forte pour conserver les gènes à faibles effets. Les faibles niveaux d'accroissement observés de la résistance sont donc une conséquence directe de ces choix. Cependant, la population de départ étant résistante, les allèles associés aux résistances sont tout de même présents dans nos lignées mais probablement à des fréquences faibles qui se révèlent difficile à mettre en évidence par bioessais.

Après avoir créé les lignées divergentes, nous avons effectué une analyse de transcriptomique par un séquençage ARN (Chapitre 2), afin d'identifier si des différences en termes d'expression génique et de polymorphisme dans les transcrits étaient associées à des résistances. Cela nous a également permis d'identifier si des mécanismes étaient communs entre nos différentes lignées, permettant de déterminer si notre phénotype initial de résistance à plusieurs substances actives était dû à une résistance croisée ou une résistance multiple. Notre hypothèse principale était que le phénotype résistant initial était dû à une résistance croisée, comme cela a déjà pu être montré chez *C. pomonella* (Reyes & Sauphanor, 2008).

Nous avons pu identifier différents gènes et familles de gènes associés aux résistances. Certains déjà identifiés dans la littérature chez *C. pomonella* ou chez d'autres insectes sont ressortis de nos analyses (gènes impliqués dans la détoxification : CYPs, GSTs et ABC-transporteurs), mais d'autres familles de gènes sont également présentes dans nos résultats (par exemples des gènes impliquées dans les réponses aux stress, l'immunité ou les systèmes olfactifs). Contrairement à notre hypothèse de départ, il semble que très peu de gènes soient communs aux différentes lignées, que ce soit en termes de différence d'expression génique ou de polymorphisme des transcrits. Nous observons des évolutions qui utilisent des voies

génétiques indépendantes entre les différentes lignées et même entre les différentes sous-lignées.

Cela est compatible avec l'hypothèse d'une résistance multigénique dans la population initiale, due à une accumulation de gènes et de mécanismes, plutôt qu'à une résistance croisée dû à un ou à quelques gènes à effet majeur.

L'analyse génomique réalisée dans cette thèse a eu pour objectif d'identifier les variations génétiques associées aux résistances sur les zones non-codantes du génome et sur les gènes peu ou pas exprimés (Chapitre 3). Nous avons ainsi pu, à l'aide de 3 méthodes d'analyse (analyse de la variation de fréquences alléliques en fonction des pressions de sélection manuel, analyse par scans génomiques à l'aide du logiciel BayPass et identification de variations de nombre de copies de gènes), identifier des zones sous sélection associées aux résistances. Comme précédemment, les résultats orientent plus vers une résistance multiple, c'est-à-dire polygénique avec une accumulation de mécanismes, qu'une résistance croisée, liée à un événement génétique unique.

Nos résultats montrent l'importance des mécanismes de détoxification dans ces résistances à travers l'implication de plusieurs enzymes de la famille des CYP, mais également le rôle de l'efflux dans ce phénomène. Des gènes impliqués dans ces deux mécanismes ont été identifiés dans les 3 lignées sous sélection. Grâce à l'approche de recherche de variation de nombre de copie de gène CNV, la première effectuée sur *C. pomonella*, nous avons pu identifier des zones particulièrement enrichies suite à la sélection au chlorantraniliprole et à la deltaméthrine. En ce qui concerne le chlorantraniliprole, toute une zone englobant gènes codant pour des glycoprotéines constitutives de la cuticule sur le chromosome 5 ; et pour la deltaméthrine, une zone sur le chromosome 1 porteuse de plusieurs gènes codant pour des protéines MDR, *Multi-Drug Resistance proteins*, qui sont impliquées dans des mécanismes d'efflux, ont vu leur nombre de copies de gènes augmenter suite aux pressions de sélection.

Tous ces résultats permettent d'avoir une vue globale et plus exhaustive des mécanismes de résistance chez *C. pomonella*, tout en fournissant une base solide pour des analyses et des applications basées sur des approches génomiques.

b. Mise en place de l'expérimentation d'évolution et reséquençage

Les expérimentations d'évolution et reséquençage (« evolve and resequencing studies ») et d'évolution expérimentale ont déjà été utilisées dans la recherche de gènes candidats impliqués dans les résistances, notamment dans l'étude de trajectoire évolutives chez les micro-organismes (Remigi et al., 2019), ainsi que dans l'identification des mécanismes évolutifs impliqués dans les mécanismes de résistances chez différents insectes (Pélissié et al., 2021). Elles permettent notamment de comparer le résultat de pressions de sélection contrastées en simplifiant les environnements naturels, permettant ainsi de réduire au plus possible les paramètres aléatoires pouvant entrer en jeu dans les processus sélectifs. Leur utilisation est donc idéale pour identifier les déterminants génétiques des résistances. Cependant, des paramètres clefs sont à considérer dans la réussite de telles expérimentations. Différentes études empiriques et basées sur de la modélisation ont permis d'identifier comme primordiaux les facteurs suivants : le niveau de résistance de la population, la taille de population, le nombre de réplicas, le nombre de générations et la diversité génétique de la population initiale (Kawecki et al., 2012; Kofler & Schlötterer, 2014). De plus, il nous a fallu prendre en compte les particularités de notre organisme d'intérêt. Comme mentionné précédemment, le carpocapse des pommes n'étant pas un organisme modèle, il a fallu adapter notre design expérimental à différentes contraintes, notamment au niveau du nombre d'individus disponibles pour former chaque génération ou du temps sur lequel nous avons pu mener notre expérimentation. En effet, le temps de génération du carpocapse reste significativement plus long que d'autres organismes sur lesquels des évolutions expérimentales ont été menées (Kawecki et al., 2012), contraignant ainsi le nombre de générations sur lequel nous avons mené notre expérience. C'est pourquoi nous avons choisi de mettre en place 3 réplicas par lignée, afin de compenser les limites et minimiser les biais amenés par un temps d'expérimentation réduit. Il a également fallu réussir à atteindre un nombre satisfaisant d'individus, en arrivant à acclimater efficacement aux conditions de laboratoire notre population. Pour cela, développer une méthode d'élevage la plus optimale possible a donc été primordial. Les contraintes d'élevage du carpocapse ont ainsi grandement joué sur notre design expérimental. Si celles-ci avaient été moins lourdes, il aurait pu être opportun de rajouter plusieurs générations de sélection avant d'effectuer le croisement avec la souche sensible, pour ainsi avoir des fréquences d'allèles associés à la résistance plus fortes dans nos différentes lignées. Une autre des contraintes a été relative au phénotypage que nous avons utilisé lors de l'expérimentation, qui nécessite d'être menée sur

les descendants de la génération testée pour en évaluer son niveau de résistance (Reyes & Sauphanor, 2008). Même si cette méthode de phénotypage est la méthode standard utilisée (notamment lors des campagnes de surveillance biologique du territoire), il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres méthodes permettant un phénotypage direct de la génération testée (en application topique par exemple (Stara & Kocourek, 2007)).

### c. Structuration génétique de nos différentes lignées

Une des particularités de notre design expérimental a été la mise en place de répliques pour chacune de nos lignées, dans l'optique de renforcer la robustesse de nos résultats. De manière surprenante, peu de gènes et de signaux de sélection communs aux trois répliques de chaque lignée ont été identifiés. Cela peut être dû à différents paramètres. La sélection insecticide sur le carpocapse des pommes est présente depuis plus de 60 ans, et a ainsi permis de sélectionner de nombreux allèles différents au cours du temps, en établissant un fond génétique varié en termes d'allèles responsables de la résistance aux substances actives. Pour constituer nos répliques, nous avons effectué un sous-échantillonnage de notre population. Dans nos analyses ceci apparaît comme étant l'élément fondateur le plus important dans la structuration génétique de nos différents répliques.

Cette structuration est notamment visible dans le cas de la lignée deltaméthrine, où l'on observe une dichotomie entre nos différents répliques. En effet, la présence de la mutation *kdr* à une fréquence plus élevée dans l'un de nos répliques a conduit à ce qu'on retrouve une forte signature de sélection dans nos analyses de scans génomiques autour de la zone concernée. En effet, cela est particulièrement frappant au niveau du chromosome 17 (où se situe le gène « voltage-gated sodium channel » portant la mutation *kdr*), où un grand nombre de SNP a été détecté comme associés à la résistance de par leur localisation sur le génome. Cela réduit la puissance de la méthode pour détecter les gènes aux effets plus faible sur le phénotype de résistance à la deltaméthrine. En effet, comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit, une résistance à une substance active peut être causée par plusieurs gènes conjointement, chacun ayant un effet faible sur le phénotype mais dont l'accumulation entraîne une résistance (Roush & Daly, 1990). Néanmoins, la présence d'un seul gène à effet fort causant la résistance dans un organisme sera généralement privilégiée par rapport à plusieurs gènes à effet faible (Roush & Tabashnik, 1990), rendant facultative l'obligation de sélectionner ces multiples gènes. C'est ce qui peut expliquer la différence que l'on observe entre les différents répliques de la lignée

deltaméthrine. Nous n'observons pas ce phénomène au niveau des autres lignées : il n'y a pas de pic particulièrement intense dans nos résultats de scans génomiques, ni dans la lignée chlorantraniliprole, ni dans la lignée spinosad ; cela signifiant que nous avons pu garder de multiples gènes à effets faibles sans que leur signal ne soit masqué et également qu'aucun gène à effet fort n'a été détecté.

Nous avons pu également remarquer lors des analyses génomiques que nos lignées sont structurées plutôt par réplica que par niveau de pression de sélection. Cela montre l'importance de l'effet du sous-échantillonnage réalisé (et ainsi de l'impact du fond génétique) dans les résultats obtenus, malgré l'attention que nous avons porté lors de la conduite de l'expérimentation pour qu'il y ait panmixie et un nombre suffisant d'individus à chaque génération. Ainsi, l'évènement de sous-échantillonnage apparaît comme jouer un rôle plus important que la force de la pression de sélection dans la structure de la population.

### III. Limites de l'étude et perspectives

#### a. D'autres mécanismes de résistance ?

La combinaison d'approches de transcriptomique et de génomique nous a permis d'explorer en profondeur les mécanismes de résistance à différentes substances actives. Cependant, d'autres mécanismes n'étant pas détectés par ces approches peuvent également jouer un rôle dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans les résistances. C'est le cas de l'épigénétique par exemple. Il s'agit de changements héréditaires dans l'expression génique sans qu'il y ait de modification de la séquence d'ADN des individus. Trois principaux types de mécanismes existent : la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'expression de microARNs (Baccarelli & Bollati, 2009). Ces mécanismes ont déjà été montrés comme causés par des facteurs environnementaux, dont les pesticides (Collotta et al., 2013). Il paraît ainsi intéressant de se demander s'ils peuvent être impliqués dans les résistances à ces derniers. Il a déjà été montré chez *Leptinotarsa decemlineata*, où une exposition sublétales à des insecticides a provoqué un changement dans la méthylation de l'ADN de gènes associés à de la résistance insecticide.

Les technologies 'omiques' permettent également d'ouvrir la voie à d'autres découvertes en matière d'identification de mécanismes causaux des résistances. L'implication du métabolome



dans la résistance aux insecticides a déjà été suggérée par différentes études (Aliferis & Jabaji, 2011). Cependant, très peu d'études se sont penchées sur le rôle du métabolome dans la résistance aux insecticides. En effet, même si l'étude de changements métabolomiques n'est pas pertinente lorsque des insecticides neurotoxiques sont utilisés à des doses létales, l'utilisation de ce type d'analyses vis-à-vis d'insecticides ayant un effet sur des voies de biosynthèse, de production d'énergie ou sur le développement des individus pourrait cependant être appropriée (Aliferis & Chrysayi-Tokousbalides, 2011).

#### b. Annotation du génome

Nous avons pu remarquer dans nos différentes analyses qu'un nombre conséquent de gènes identifiés n'avaient pas d'annotation disponible ou n'étaient pas caractérisés. Nous avons pu surmonter ce problème en nous basant sur une liste de gènes candidats pour être impliqués dans des mécanismes de résistance, mais cela pose question sur la faisabilité d'analyses se basant sur des données de séquençage dans le cas où un génome n'est que partiellement annoté. Cela pose en particulier problème en termes d'interprétation des résultats. Cependant, le nombre de gènes impliqués directement dans les mécanismes de résistance n'ayant pas d'annotation est probablement faible. Toutefois, ce sont les mécanismes qui pourraient être considérés comme secondaires ou être impliqués dans d'autres fonctions physiologiques ou métaboliques (par exemple : comportement, signalisation ou pénétration réduite dans l'individu par exemple) qui peuvent dans ce cas ne pas être identifiés.

#### c. Création d'un outil de détection des résistances

Dans cette étude, nous avons pu identifier de multiples marqueurs associés à la résistance à la deltaméthrine, au chlorantraniliprole et au spinosad chez le carpocapse des pommes. Ce qui constitue une étape clef dans une meilleure compréhension des mécanismes de résistance aux insecticides chez le carpocapse des pommes. Dans le contexte plus appliqué de la détection des résistances, les marqueurs identifiés semblent être des candidats intéressants dans le développement d'outils de détection de ces résistances.

Cependant, nous avons pu voir à travers nos différentes analyses que nos lignées et sous-lignées ne sont pas homogènes et ne sont pas passées par les mêmes voies évolutives pour arriver à ce qu'elles aient un phénotype résistant. Cela pose question quant aux choix à effectuer entre ces marqueurs et la fiabilité de ceux-ci, notamment en termes de versatilité par

rapport aux populations susceptibles d'être testées sur leur résistance, d'autant plus vis-à-vis de la diversité génétique des populations en milieu naturel. Différentes solutions peuvent être envisagées pour palier à cela.

Par exemple, une approche de validation fonctionnelle peut-être envisagée, afin de mieux comprendre la fonction et le rôle des gènes dans les phénotypes de résistance. Pour cela, comme indiqué dans l'introduction, différentes méthodes sont possibles : des mesures *in vitro* de l'activité de la protéine en présence d'insecticide peuvent être effectuées (Riveron et al., 2013) de méthodes d'édition de génome comme CRISPR-Cas9 (Douris et al., 2020) ou de silencing via ARN interférant (Bautista et al., 2015). Cette dernière méthode, auparavant très complexe à mettre en œuvre chez les Lépidoptères, est graduellement en train de se développer de plus en plus efficacement (Terenius et al., 2011).

La caractérisation des marqueurs moléculaires de la résistance aux insecticides chez le carpocapse des pommes présente un intérêt majeur en permettant une détection précoce des divers mécanismes de résistance sur le terrain et un suivi de leur évolution dans l'espace et le temps. Pour atteindre cet objectif, il est donc nécessaire de valider les marqueurs identifiés dans cette étude, de découvrir de nouveaux marqueurs associés à d'autres zones géographiques, et de les tester sur plusieurs populations résistantes d'origines variées avant de développer un outil de diagnostic.

## Table des figures et tableaux

Figure 1 : Nombre cumulé d'espèces reportées comme étant résistantes à la matière active indiquée, pendant les 14 ans suivant leur mise sur le marché, d'après Sparks et al., 2011. ....	2
Figure 2 : Illustration des mécanismes d'apparition des résistances aux pesticides A) par mutation de novo B) par sélection depuis la variation génétique existante, d'après Hawkins et al. 2019. ....	4
Figure 3 : Schéma général montrant les différentes voies d'élimination des xénobiotiques, d'après Amezian et al., 2021. ....	7
Figure 4 : Nomenclature des monooxygénases à fonction multiple à cytochrome P450 .....	8
Figure 5 : Schéma illustrant une expérimentation d'évolution et reséquençage, d'après Schlötterer et al., 2015. ....	16
Figure 6 : Etat des lieux des résistances de <i>C. pomonella</i> dans le monde (d'après Ju et al., 2021) .....	31
Figure 7 : Différentes étapes de l'élevage du carpocapse des pommes en laboratoire .....	45
Figure 8 : Schéma du design expérimental .....	48
Figure 9 : Taux de croissance (nombre d'adultes à la génération n / nombre d'adultes à la génération n-1) et taux de survie (nombre d'adultes émergés / nombre de larves installées n sur milieu artificiel) pour les générations 1 à 5 de l'évolution expérimentale en absence de pression de sélection. Les encadrés au-dessus de chaque barre indiquent le nombre de h larves déposées et le nombre de papillons émergés à chaque génération. n .....	59
Figure 10 : Taux d'installation (panneaux 'Installation'), d'émergence (panneaux 'Émergence') et d'émergence des larves s'étant installées avec succès (panneaux 'Emergence_installees') selon différentes modalités testées au préalable du lancement des phases de sélection de notre évolution expérimentale. Pour chaque modalité, O et N correspondent à Oui ou Non, 18-G et 18-D correspondent aux paillasses de notre salle d'élevage, n correspond au nombre de larves considérées. Si des différences significatives sont présentes, elles ont été représentées par des étoiles (**= P ≤ 0,001; ***= P ≤ 0,0001). Modalités : A : Milieu percé / B : Présence de levure / C : Mise à l'envers / D : Emplacement / E : Sortie du froid / F : Moment de pose / G : Nombre de poses par jour. ....	61
Figure 11 : Mortalités corrigées (±erreur standard) à 21 jours post-installation (Stade 'Installation') et à l'émergence (Stade 'Emergence') pour chaque génération et chaque lignée sous sélection de notre évolution expérimentale (A : Lignée Chlorantraniliprole, B : Lignée Deltaméthrine, C : Lignée Spinosad). La correction de mortalité s'est faite par rapport à notre lignée Témoin et les réplicas (à partir de la génération F7) ont été poolés. Pour les F9 et F10, DM : Sous-lignée Dose Moyenne /	

DH : Sous-lignée Dose Haute. Les différences significatives entre stades d'une même génération sont indiquées (n.s. : p-value >0,05 ; \* : p-value ≤0,05 ; \*\* : p-value ≤0,01 ; \*\*\* : p-value ≤0,001). 62

Figure 12 : DL50 (± erreur standard) des différentes sous-lignées chlorantraniliprole (A), deltaméthrine (B) et spinosad (C) aux générations F9-10, calculées grâce aux bioessais en plaques de microtitration. Les différences significatives entre sous-lignées sont indiquées (n.s. : p-value >0,05 ; \* : p-value ≤0,05 ; \*\* : p-value ≤0,01 ; \*\*\* : p-value ≤0,001). ..... 65

Figure 13 : Activité enzymatique des carboxylestérases (CbE) mesurée en nmol d'α-naphtol.min-1.mg de protéine-1, des glutathion-S-transférases (GST) mesurée en nmol de CDNB-GST.min-1.mg de protéine-1 et mono-oxygénases à fonction multiple (MFO) mesurée en pg de 7EC.min-1.mg de protéine-1. Les mesures ont été effectuées sur des individus mâles (A) et femelles (B) dès leur émergence, issus des différentes sous-lignées des F9-10 (C : Control, DM : Dose Moyenne, DH : Dose Haute). Des lettres différentes indiquent une différence significative (α = 0,05)..... 68

Figure 14 : Durée de développement (en jours) de l'éclosion à l'émergence des adultes dans la lignée T en fonction des générations (G6, G7 et G8)..... 71

Figure 15 : Durée de développement (en jours) de l'éclosion à l'émergence des adultes dans la lignée T en fonction de son croisement avec la population de référence sensible de laboratoire (SV) ou non. .... 71

Figure 16 : Vitesse de développement de l'éclosion à l'émergence des adultes dans la lignée DEL (A), CHL (B) et SPI (C)..... 72

Figure 17 : Vitesse de développement de l'éclosion à l'émergence des adultes dans les dernières générations des lignées DEL (A), CHL (B) et SPI (C). .... 73

Figure 18 : Durée de développement (en jours) de l'éclosion à l'émergence des adultes dans les différentes lignées soumises à une pression insecticide, lors de la forte pression de sélection (F7 pour CHL et SPI, F8 pour DEL) ..... 74

Figure 19 : Schéma du design expérimental. Les ronds violets correspondent aux générations pour lesquelles des pools d'individus ont été séquencés. .... 153

Figure 20 : Représentations des Pi de Tajima des différents échantillons séquencés..... 162

Figure 21 : ACP effectuée sur tous les échantillons séquencés ..... 163

Figure 22 : ACP effectuée sur tous les échantillons issus des dernières générations de l'expérimentation (F9 et F10) ..... 163

Figure 23 : ACP effectuée sur les échantillons issus de la lignée TSV et des sous-lignées Chlorantraniliprole..... 164

Figure 24 : ACP effectuée sur les échantillons issus de la lignée TSV et des sous-lignées Deltaméthrine ..... 164

Figure 25 : ACP effectuée sur les échantillons issus de la lignée TSV et des sous-lignées Spinosad ..... 165

Figure 26 : Manhattan plot représentant Les SNPs ayant passé les différents filtres de fréquences, selon leur variation entre les conditions C et HD, pour les lignées chlorantraniliprole. Les SNPs présents au-dessus de la ligne noire font partie des 1% les plus variés. La zone noire sur le chromosome 17 correspond au gène « voltage-gated sodium channel» où se trouve la mutation kdr..... 169

Figure 27 : Manhattan plot des SNP ayant passé les différents filtres de fréquences pour les lignées chlorantraniliprole, en fenêtres glissantes de 50kb, selon le nombre de SNP présents au sein des 1% les plus variés..... 170

Figure 28 : Manhattan plot représentant Les SNPs faisant partie des 1% qui ont les BF les plus élevés, pour les lignées chlorantraniliprole..... 171

Figure 29: Manhattan plot représentant le nombre de SNP ayant des BF > 15, en fenêtres glissantes de 50kb, pour les lignées chlorantraniliprole..... 172

Figure 30 : Manhattan plot représentant les SNPs ayant passé les différents filtres de fréquences, selon leur variation entre les conditions C et HD, pour les lignées deltaméthrine. Les SNPs présents au-dessus de la ligne noire font partie des 1% les plus variés. La zone noire sur le chromosome 17 correspond au gène « voltage-gated sodium channel» où se trouve la mutation kdr..... 181

Figure 31 : Manhattan plot des SNP ayant passé les différents filtres de fréquences pour les lignées deltaméthrine, en fenêtres glissantes de 50kb, selon le nombre de SNP présents au sein des 1% les plus variés ..... 182

Figure 32 : Manhattan plot représentant Les SNPs faisant partie des 1% qui ont les BF les plus élevés, pour les lignées deltaméthrine..... 183

Figure 33 : Manhattan plot représentant le nombre de SNP ayant des BF > 15, en fenêtres glissantes de 50kb, pour les lignées deltaméthrine ..... 184

Figure 34 : Manhattan plot représentant Les SNPs ayant passé les différents filtres de fréquences, selon leur variation entre les conditions C et HD, pour les lignées spinosad. Les SNPs présents au-dessus de la ligne noire font partie des 1% les plus variés. La zone noire sur le chromosome 17 correspond au gène « voltage-gated sodium channel» où se trouve la mutation kdr. .... 196

Figure 35 : Manhattan plot des SNP ayant passé les différents filtres de fréquences pour les lignées spinosad, en fenêtres glissantes de 50kb, selon le nombre de SNP présents au sein des 1% les plus variés..... 197

Figure 36 : Manhattan plot représentant Les SNPs faisant partie des 1% qui ont les BF les plus élevés, pour les lignées spinosad ..... 198

Figure 37 : Manhattan plot représentant le nombre de SNP ayant des BF > 15, en fenêtres glissantes de 50kb, pour les lignées spinosad..... 199

Figure 38 : Représentation des zones d'intérêt (lignes rouges) suite à l'analyse par filtrages de fréquences alléliques sur le génome de <i>C. pomonella</i> , pour les lignées chlorantraniliprole (A), spinosad (B) et deltaméthrine (C). La représentation s'est faite via le logiciel IGV.....	207
Tableau 1 : Substances actives utilisées contre <i>C. pomonella</i> .....	28
Tableau 2 : Résultats des bioessais effectués lors de de la campagne annuelle de surveillance biologique du territoire en 2017 sur notre population initiale.....	41
Tableau 3 : Concentration (ppm) en substances actives utilisées lors de l'évolution expérimentale et lors des bioessais effectués lors de la dernière génération de chaque sous-lignée.....	48
Tableau 4 : Nombre d'individus adultes de chaque génération qui ont été utilisés pour former la génération suivante de l'évolution expérimentale.....	55
Tableau 5 : Concentrations (en ppm), doses létales (DL) visées et réalisées et mortalité observée (corrigée par rapport à la lignée Témoin) pour chacune des générations sous sélection de l'expérimentation d'évolution expérimentale. Les bioessais de vérification ont permis de calculer les DL réalisées pour chaque génération.....	63
Tableau 6 : Nombre de mâles et femelles présents dans les différents échantillons en pool utilisés lors des analyses génomiques.....	154
Tableau 7 : Conditions pour qu'un SNP passe les filtres de fréquences alléliques.....	156
Tableau 8 : Conditions pour qu'un gène soit considéré comme enrichi dans les analyses de CNV.....	159
Tableau 9 : Conditions pour qu'un gène soit considéré comme enrichi pour les échantillons DEL R1 75 et DEL R2 75.....	159
Tableau 10 : Gènes pour lesquels un SNP a passé les filtres de fréquence alléliques et l'indication du gène candidat associé, pour les lignées chlorantraniliprole (avec correspondance avec les identifiants du génome de référence 'Gene ID' ou de notre base de données de gènes candidats 'Gène candidat').....	174
Tableau 11 : SNPs identifiés suite au scan génomique, localisés dans des gènes appartenant à notre liste de gènes candidats (avec correspondance avec les identifiants du génome de référence 'Gene ID' ou de notre transcriptome 'Transcript ID') pour les lignées chlorantraniliprole.....	175
Tableau 12 : Gènes appartenant à la liste de gènes candidats ayant leur nombre de copies enrichi pour les lignées chlorantraniliprole.....	177
Tableau 13 : Gènes pour lesquels un SNP a passé les filtres de fréquence alléliques et l'indication du gène candidat associé, pour les lignées deltaméthrine.....	186
Tableau 14 : SNPs identifiés suite au scan génomique, localisés dans des gènes appartenant à notre liste de gènes candidats (avec correspondance avec les identifiants du génome ou de notre transcriptome) pour les lignées deltaméthrine.....	188

Tableau 15 : Gènes appartenant à la liste de gènes candidats ayant leur nombre de copies enrichi pour les lignées deltaméthrine.....	193
Tableau 16 : Gènes pour lesquels un SNP a passé les filtres de fréquence alléliques et l'indication du gène candidat associé, pour les lignées spinosad.....	202
Tableau 17 : SNPs identifiés suite au scan génomique, localisés dans des gènes appartenant à notre liste de gènes candidats (avec correspondance avec les identifiants du génome ou de notre transcriptome) pour les lignées spinosad.....	204
Tableau 18 : Gènes appartenant à la liste de gènes candidats ayant leur nombre de copies enrichi pour les lignées spinosad.....	205
Tableau 19 : SNPs identifiés après scan génomique présents dans différentes lignées à la fois.....	208
Tableau 20 : Gènes candidats dans les lesquels un SNP a été identifié suite aux scans génomiques, présents dans différentes lignées à la fois (CHL : lignées chlorantraniliprole, DEL : lignées deltaméthrine, SPI : lignées spinosad).....	208
Tableau 21 : Nombre, impact et localisation des SNPs identifiés suite au scans génomiques dans les différentes lignées.....	209
Tableau 22 : Gènes ayant vu leur nombre de copies enrichi présents au sein de répliques de plusieurs lignées.....	209

## Références bibliographiques

- Adak, T., & Mukherjee, I. (2016). Investigating Role of Abiotic Factors on Spinosad Dissipation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *96*(1), 125-129.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-015-1644-z>
- Agrawal, A., Ramasamy, G. G., Pathak, J., Nayyar, N., Muthugounder, M., Maria, P., Rai, A., & Thiruvengadam, V. (2022). Deciphering the Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance From the Transcriptome Data of Field Evolved Spinosad Resistant and Susceptible Populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, *115*(4), 1268-1278. <https://doi.org/10.1093/jee/toac072>
- Ahn, S.-J., Vogel, H., & Heckel, D. G. (2012). Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *42*(2), 133-147.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.11.006>
- Akbar, S. M., Aurade, R. M., Sharma, H. C., & Sreeramulu, K. (2014). Mitochondrial P-Glycoprotein ATPase Contributes to Insecticide Resistance in the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Noctuidae : Lepidoptera). *Cell Biochemistry and Biophysics*, *70*(1), 651-660.  
<https://doi.org/10.1007/s12013-014-9969-5>
- Aliferis, K. A., & Chrysayi-Tokousbalides, M. (2011). Metabolomics in pesticide research and development : Review and future perspectives. *Metabolomics*, *7*(1), 35-53.  
<https://doi.org/10.1007/s11306-010-0231-x>
- Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2011). Metabolomics – A robust bioanalytical approach for the discovery of the modes-of-action of pesticides : A review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *100*(2), 105-117. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.03.004>
- Amezian, D., Nauen, R., & Le Goff, G. (2021). Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification genes in insects—An overview. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *174*, 104822.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104822>



- Assogba, B. S., Djogbénou, L. S., Milesi, P., Berthomieu, A., Perez, J., Ayala, D., Chandre, F., Makoutodé, M., Labbé, P., & Weill, M. (2015). An ace-1 gene duplication resorbs the fitness cost associated with resistance in *Anopheles gambiae*, the main malaria mosquito. *Scientific Reports*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep14529>
- Baccarelli, A., & Bollati, V. (2009). Epigenetics and environmental chemicals. *Current Opinion in Pediatrics*, 21(2), 243-251. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32832925cc>
- Bailey, S. F., & Bataillon, T. (2016). Can the experimental evolution programme help us elucidate the genetic basis of adaptation in nature? *Molecular Ecology*, 25(1), 203-218. <https://doi.org/10.1111/mec.13378>
- Balabanidou, V., Grigoraki, L., & Vontas, J. (2018). Insect cuticle : A critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.03.001>
- Balachowsky, A. S. (1966). Entomologie appliquée à l'agriculture. Tome II, Lépidoptères. *Ed. Masson et Cie Paris*, 2(Lépidoptères). <https://bibliotheques.mnhn.fr/medias/doc/exploitation/HORIZON/457917/entomologie-appliquee-a-l-agriculture-tome-ii-lepidopteres-premier-volume-hepialoidea-stigmelloidea->
- Barghi, N., Hermisson, J., & Schlötterer, C. (2020). Polygenic adaptation : A unifying framework to understand positive selection. *Nature Reviews Genetics*, 21(12), 769-781. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0250-z>
- Barrett, R. D. H., & Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(1), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.008>
- Barrick, J. E., & Lenski, R. E. (2013). Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics*, 14(12), Article 12. <https://doi.org/10.1038/nrg3564>
- Bass, C., & Field, L. M. (2011). Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Management Science*, 67(8), 886-890. <https://doi.org/10.1002/ps.2189>

- Bass, C., Puinean, A. M., Zimmer, C. T., Denholm, I., Field, L. M., Foster, S. P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., & Williamson, M. S. (2014). The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *51*, 41-51.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.003>
- Battlay, P., Schmidt, J. M., Fournier-Level, A., & Robin, C. (2016). Genomic and Transcriptomic Associations Identify a New Insecticide Resistance Phenotype for the Selective Sweep at the Cyp6g1 Locus of *Drosophila melanogaster*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, *6*(8), 2573-2581.  
<https://doi.org/10.1534/g3.116.031054>
- Bautista, M. A. M., Bhandary, B., Wijeratne, A. J., Michel, A. P., Hoy, C. W., & Mittapalli, O. (2015). Evidence for trade-offs in detoxification and chemosensation gene signatures in *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*, *71*(3), 423-432. <https://doi.org/10.1002/ps.3822>
- Beers, E. H., Suckling, D. M., Prokopy, R. J., & Avilla, J. (2003). Ecology and management of apple arthropod pests. In D. C. Ferree & I. J. Warrington (Éds.), *Apples : Botany, production and uses* (p. 489-519). CABI. <https://doi.org/10.1079/9780851995922.0489>
- Belinato, T. A., Martins, A. J., Belinato, T. A., & Martins, A. J. (2016). Insecticide Resistance and Fitness Cost. In *Insecticides Resistance*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61826>
- Bock, K. W. (2016). The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily expressed in humans, insects and plants : Animal-plant arms-race and co-evolution. *Biochemical Pharmacology*, *99*, 11-17.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.10.001>
- Boivin, T., Bouvier, J. C., Chadœuf, J., Beslay, D., & Sauphanor, B. (2003). Constraints on adaptive mutations in the codling moth *Cydia pomonella* (L.) : Measuring fitness trade-offs and natural selection. *Heredity*, *90*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800188>
- Boivin, T., Chadœuf, J., Bouvier, J.-C., Beslay, D., & Sauphanor, B. (2005). Modelling the interactions between phenology and insecticide resistance genes in the codling moth *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, *61*(1), 53-67. <https://doi.org/10.1002/ps.945>

- Boivin, T., D'Hières, C. C., Bouvier, J. C., Beslay, D., & Sauphanor, B. (2001). Pleiotropy of insecticide resistance in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 99(3). <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00838.x>
- Bonizzoni, M., Ochomo, E., Dunn, W. A., Britton, M., Afrane, Y., Zhou, G., Hartsel, J., Lee, M.-C., Xu, J., Githeko, A., Fass, J., & Yan, G. (2015). RNA-seq analyses of changes in the *Anopheles gambiae* transcriptome associated with resistance to pyrethroids in Kenya : Identification of candidate-resistance genes and candidate-resistance SNPs. *Parasites & Vectors*, 8(1), 474. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1083-z>
- Borden, A. D. (1931). Some Field Observations On Codling Moth Behavior. *Journal of Economic Entomology*, 24(6), 1137-1145. <https://doi.org/10.1093/jee/24.6.1137>
- Bosch, D., Avilla, J., Musleh, S., & Rodríguez, M. A. (2018). Target-site mutations (AChE and kdr), and PSMO activity in codling moth (*Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera : Tortricidae)) populations from Spain. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 146, 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.010>
- Botto, E., & Glaz, P. (2010). Potential for controlling codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera : Tortricidae) in Argentina using the sterile insect technique and egg parasitoids. *Journal of Applied Entomology*, 134(3), 251-260. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01389.x>
- Bouvier, J.-C., Boivin, T., Beslay, D., & Sauphanor, B. (2002). Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51(2), 55-66. <https://doi.org/10.1002/arch.10052>
- Brogdon, W. G. (1989). Biochemical resistance detection : An alternative to bioassay. *Parasitology Today*, 5(2), 56-60. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90192-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90192-0)
- Brun-Barale, A., Bouvier, J.-C., Pauron, D., Bergé, J.-B., & Sauphanor, B. (2005). Involvement of a sodium channel mutation in pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L, and development of

- a diagnostic test. *Pest Management Science*, 61(6), 549-554.  
<https://doi.org/10.1002/ps.1002>
- Buès, R., Bouvier, J. C., & Boudinhon, L. (2005). Insecticide resistance and mechanisms of resistance to selected strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) in the south of France. *Crop Protection*, 24(9), 814-820. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.01.006>
- Bush, M. R., Abdel-All, Y. A., & Rock, G. C. (1993). Parathion Resistance and Esterase Activity in Codling Moth (Lepidoptera : Tortricidae) from North Carolina. *Journal of Economic Entomology*, 86(3), 660-666. <https://doi.org/10.1093/jee/86.3.660>
- Cassanelli, S., Reyes, M., Rault, M., Carlo Manicardi, G., & Sauphanor, B. (2006). Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(8), 642-653.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.05.007>
- Cattel, J., Faucon, F., Le Péron, B., Sherpa, S., Monchal, M., Grillet, L., Gaude, T., Laporte, F., Dusfour, I., Reynaud, S., & David, J. (2020). Combining genetic crosses and pool targeted DNA-seq for untangling genomic variations associated with resistance to multiple insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*. *Evolutionary Applications*, 13(2), 303-317.  
<https://doi.org/10.1111/eva.12867>
- Chen, E.-H., & Hou, Q.-L. (2021). Identification and expression analysis of cuticular protein genes in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera : Plutellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 178, 104943. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104943>
- Claudianos, C., Russell, R. J., & Oakeshott, J. G. (1999). The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(8), 675-686. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00035-1)
- Collins, E. L., Phelan, J. E., Hubner, M., Spadar, A., Campos, M., Ward, D., Acford-Palmer, H., Gomes, A. R., Silva, K., Ferrero Gomez, L., Clark, T. G., & Campino, S. (2022). A next generation

- targeted amplicon sequencing method to screen for insecticide resistance mutations in *Aedes aegypti* populations reveals a rdl mutation in mosquitoes from Cabo Verde. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16(12), e0010935.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010935>
- Collotta, M., Bertazzi, P. A., & Bollati, V. (2013). Epigenetics and pesticides. *Toxicology*, 307, 35-41.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.017>
- Cutler, G. C. (2013). Insects, Insecticides and Hormesis : Evidence and Considerations for Study. *Dose-Response*, 11(2), dose-response.12-008.Cutler. <https://doi.org/10.2203/dose-response.12-008.Cutler>
- Cutler, G. C., & Guedes, R. N. C. (2017). Occurrence and Significance of Insecticide-Induced Hormesis in Insects. In S. O. Duke, P. Kudsk, & K. Solomon (Éds.), *ACS Symposium Series* (Vol. 1249, p. 101-119). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2017-1249.ch008>
- Daborn, P. J., Lumb, C., Boey, A., Wong, W., ffrench-Constant, R. H., & Batterham, P. (2007). Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(5), 512-519. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.02.008>
- Daborn, P. J., Yen, J. L., Bogwitz, M. R., Le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T. G., & ffrench-Constant, R. H. (2002). A Single P450 Allele Associated with Insecticide Resistance in *Drosophila*. *Science*, 297(5590), 2253-2256.  
<https://doi.org/10.1126/science.1074170>
- Dai, W.-T., Li, J., & Ban, L.-P. (2022). Genome-Wide Selective Signature Analysis Revealed Insecticide Resistance Mechanisms in *Cydia pomonella*. *Insects*, 13(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.3390/insects13010002>
- Denholm, I., Pickett, J. A., Devonshire, A. L., Bergé, J., Feyereisen, R., & Amichot, M. (1998). Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philosophical*

- Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 353(1376), 1701-1705. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0321>
- Dermauw, W., Osborne, E., Clark, R. M., Grbić, M., Tirry, L., & Van Leeuwen, T. (2013). A burst of ABC genes in the genome of the polyphagous spider mite *Tetranychus urticae*. *BMC Genomics*, 14(1), 317. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-317>
- Dermauw, W., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.11.001>
- Dermauw, W., Van Leeuwen, T., & Feyereisen, R. (2020). Diversity and evolution of the P450 family in arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 103490. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103490>
- Devonshire, A. L., & Field, L. M. (1991). Gene Amplification and Insecticide Resistance. *Annual Review of Entomology*, 36(1), 1-21. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.36.010191.000245>
- Devonshire, A. L., Heidari, R., Bell, K. L., Campbell, P. M., Campbell, B. E., Odgers, W. A., Oakeshott, J. G., & Russell, R. J. (2003). Kinetic efficiency of mutant carboxylesterases implicated in organophosphate insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 76(1), 1-13. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00054-3)
- Donnelly, M. J., Isaacs, A. T., & Weetman, D. (2016). Identification, validation and application of molecular diagnostics for insecticide resistance in malaria vectors. *Trends in parasitology*, 32(3), 197-206. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.001>
- Douris, V., Denecke, S., Van Leeuwen, T., Bass, C., Nauen, R., & Vontas, J. (2020). Using CRISPR/Cas9 genome modification to understand the genetic basis of insecticide resistance : *Drosophila* and beyond. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 167, 104595. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104595>

- Dunley, J. E., & Welter, S. C. (2000). Correlated insecticide cross-resistance in azinphosmethyl resistant codling moth (Lepidoptera : Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 93(3), 955-962. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.3.955>
- Dyck, V. A. (2010). *Rearing codling moth for the sterile insect technique*. Food and Agriculture Organization.
- Enayati, A. A., Ranson, H., & Hemingway, J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*, 14(1), 3-8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00529.x>
- Farnsworth, C. A., Teese, M. G., Yuan, G., Li, Y., Scott, C., Zhang, X., Wu, Y., Russell, R. J., & Oakeshott, J. G. (2010). Esterase-based metabolic resistance to insecticides in heliothine and spodopteran pests. *Journal of Pesticide Science*, 35(3), 275-289. <https://doi.org/10.1584/jpestics.R10-13>
- Faucon, F. (2015). *Etude des mécanismes de résistance du moustique Aedes aegypti aux insecticides pyréthrinoïdes : Apports des nouvelles technologies de séquençage ADN à l'identification de nouveaux marqueurs de résistance*. [These de doctorat, Université Grenoble Alpes (ComUE)]. <https://theses.fr/2015GREAV027>
- Faucon, F., Gaude, T., Dusfour, I., Navratil, V., Corbel, V., Juntarajumnong, W., Girod, R., Poupardin, R., Boyer, F., Reynaud, S., & David, J.-P. (2017). In the hunt for genomic markers of metabolic resistance to pyrethroids in the mosquito *Aedes aegypti* : An integrated next-generation sequencing approach. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(4), e0005526. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005526>
- Feyereisen, R. (1995). Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicology Letters*, 82-83, 83-90. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(95\)03470-6](https://doi.org/10.1016/0378-4274(95)03470-6)
- Feyereisen, R. (2006). Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions*, 34(6), 1252-1255. <https://doi.org/10.1042/BST0341252>

- French-Constant, R. H., & Bass, C. (2017). Does resistance really carry a fitness cost? *Current Opinion in Insect Science*, 21, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.04.011>
- Field, L. M., Blackman, R. L., Tyler-Smith, C., & Devonshire, A. L. (1999). Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, 339(3), 737-742. <https://doi.org/10.1042/bj3390737>
- Field, L. M., & Devonshire, A. L. (1997). Structure and organization of amplicons containing the E4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochemical Journal*, 322(3), 867-871. <https://doi.org/10.1042/bj3220867>
- Frankham, R. (1995). Effective population size/adult population size ratios in wildlife : A review. *Genetics Research*, 66(2), 95-107. <https://doi.org/10.1017/S0016672300034455>
- Fritz, M. L. (2022). Utility and challenges of using whole-genome resequencing to detect emerging insect and mite resistance in agroecosystems. *Evolutionary Applications*, 15(10), 1505-1520. <https://doi.org/10.1111/eva.13484>
- Gao, Y., Kim, K., Kwon, D. H., Jeong, I. H., Clark, J. M., & Lee, S. H. (2018). Transcriptome-based identification and characterization of genes commonly responding to five different insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 144, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.007>
- Gautier, M. (2015). Genome-Wide Scan for Adaptive Divergence and Association with Population-Specific Covariates. *Genetics*, 201(4), 1555-1579. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.181453>
- Gautier, M., Vitalis, R., Flori, L., & Estoup, A. (2022). F-Statistics estimation and admixture graph construction with Pool-Seq or allele count data using the R package poolfstat. *Molecular Ecology Resources*, 22(4), 1394-1416. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13557>
- Goh, D. K. S., Anspaugh, D. D., Motoyama, N., Rock, G. C., & Roe, R. M. (1995). Isolation and Characterization of an Insecticide-Resistance-Associated Esterase in the Tobacco Budworm



- Heliothis virescens* (F.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51(3), 192-204.  
<https://doi.org/10.1006/pest.1995.1019>
- Gott, R. C., Kunkel, G. R., Zobel, E. S., Lovett, B. R., & Hawthorne, D. J. (2017). Implicating ABC Transporters in Insecticide Resistance : Research Strategies and a Decision Framework. *Journal of Economic Entomology*, 110(2), 667-677. <https://doi.org/10.1093/jee/tox041>
- Grant, D. F., & Hammock, B. D. (1992). Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Molecular and General Genetics MGG*, 234(2), 169-176. <https://doi.org/10.1007/BF00283836>
- Groeters, F., & Tabashnik, B. (2001). Roles of Selection Intensity, Major Genes, and Minor Genes in Evolution of Insecticide Resistance. *Journal of economic entomology*, 93, 1580-1587.  
<https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.6.1580>
- Guedes, R. N. C., & Cutler, G. C. (2014). Insecticide-induced hormesis and arthropod pest management. *Pest Management Science*, 70(5), 690-697. <https://doi.org/10.1002/ps.3669>
- Guennelon, G., Audemard, H., Fremond, J.-C., & El Idrissi Ammari, M. A. (1981). Progrès réalisés dans l'élevage permanent du Carpocapse (*Laspeyresia pomonella* L.) sur milieu artificiel. *Agronomie*, 1(1), 59-64. <https://doi.org/10.1051/agro:19810108>
- Haritos, V. S., Butty, J. S., Brennan, S. E., French, J. R. J., & Ahokas, J. T. (1996). Glutathione transferases and glutathione-binding proteins of termites : Purification and characterisation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26(6), 617-625. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(96\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(96)00019-7)
- Hawkins, N. J., Bass, C., Dixon, A., & Neve, P. (2019). The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews*, 94(1), 135-155. <https://doi.org/10.1111/brv.12440>
- He, W., You, M., Vasseur, L., Yang, G., Xie, M., Cui, K., Bai, J., Liu, C., Li, X., Xu, X., & Huang, S. (2012). Developmental and insecticide-resistant insights from the de novo assembled transcriptome of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Genomics*, 99(3), 169-177.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.12.009>

- Heckel, D. G. (2012). Learning the ABCs of Bt : ABC transporters and insect resistance to *Bacillus thuringiensis* provide clues to a crucial step in toxin mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *104*(2), 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.007>
- Hedrick, P. W. (2013). Adaptive introgression in animals : Examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Molecular Ecology*, *22*(18), 4606-4618. <https://doi.org/10.1111/mec.12415>
- Heidel-Fischer, H. M., & Vogel, H. (2015). Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. *Current Opinion in Insect Science*, *8*, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.02.004>
- Higgins, C. F. (1992). ABC Transporters : From Microorganisms to Man. *Annual Review of Cell Biology*, *8*(1), 67-113. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.000435>
- Hoang, K. L., Morran, L. T., & Gerardo, N. M. (2016). Experimental Evolution as an Underutilized Tool for Studying Beneficial Animal–Microbe Interactions. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01444>
- Hubbard, C. B., & Gerry, A. C. (2021). Genetic evaluation and characterization of behavioral resistance to imidacloprid in the house fly. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *171*, 104741. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104741>
- Hunter, B., Wright, K. M., & Bomblies, K. (2013). Short read sequencing in studies of natural variation and adaptation. *Current Opinion in Plant Biology*, *16*(1), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.10.003>
- Ibrahim, S. A., & Ottea, J. A. (1995). Biochemical and Toxicological Studies with Laboratory and Field Populations of *Heliothis virescens* (F.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *53*(2), 116-128. <https://doi.org/10.1006/pest.1995.1059>
- Ingham, V. A., Tennessen, J. A., Lucas, E. R., Elg, S., Yates, H. C., Carson, J., Guelbeogo, W. M., Sagnon, N., Hughes, G. L., Heinz, E., Neafsey, D. E., & Ranson, H. (2021). Integration of whole genome sequencing and transcriptomics reveals a complex picture of the reestablishment of

- insecticide resistance in the major malaria vector *Anopheles coluzzii*. *PLOS Genetics*, *17*(12), e1009970. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009970>
- İşci, M., & Ay, R. (2017). Determination of resistance and resistance mechanisms to thiacloprid in *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera : Tortricidae) populations collected from apple orchards in Isparta Province, Turkey. *Crop Protection*, *91*, 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.09.015>
- Jeffreys, H. (1961). *The Theory of Probability*. OUP Oxford.
- Joußen, N., Heckel, D. G., Haas, M., Schuphan, I., & Schmidt, B. (2008). Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 CYP6G1 expressed in cell cultures of *Nicotiana tabacum* suggests detoxification of these insecticides in Cyp6g1-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance. *Pest Management Science*, *64*(1), 65-73. <https://doi.org/10.1002/ps.1472>
- Ju, D., Mota-Sanchez, D., Fuentes-Contreras, E., Zhang, Y.-L., Wang, X.-Q., & Yang, X.-Q. (2021). Insecticide resistance in the *Cydia pomonella* (L) : Global status, mechanisms, and research directions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *178*, 104925. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104925>
- Kanga, L. H. B., Pree, D. J., van Lier, J. L., & Whitty, K. J. (1997). Mechanisms of Resistance to Organophosphorus and Carbamate Insecticides in Oriental Fruit Moth Populations (*Grapholita molesta* Busck). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *59*(1), 11-23. <https://doi.org/10.1006/pest.1997.2304>
- Karoly, E. D., Rose, R. L., Thompson, D. M., Hodgson, E., Rock, G. C., & Roe, R. M. (1996). Monooxygenase, Esterase, and Glutathione Transferase Activity Associated with Azinphosmethyl Resistance in the Tufted Apple Bud Moth, *Platynota idaeusalis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *55*(2), 109-121. <https://doi.org/10.1006/pest.1996.0040>
- Katsuhira, T., Furuya, T., Gotoh, M., Tohnishi, M., Takaishi, H., Sakata, K., Morimoto, M., & Seo, A. (2006). *Heterocyclic dicarboxylic acid diamide derivatives, agricultural/horticultural*

- insecticides and method of using the same* (European Union Brevet EP1188745B1).  
<https://patents.google.com/patent/EP1188745B1/fr?q=EP+1188745>
- Kawecki, T. J., Lenski, R. E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., & Whitlock, M. C. (2012). Experimental evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(10), 547-560.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.06.001>
- Kliot, A., & Ghanim, M. (2012). Fitness costs associated with insecticide resistance. *Pest Management Science*, 68(11), 1431-1437. <https://doi.org/10.1002/ps.3395>
- Knight, A. L. (2007). *Multiple Mating of Male and Female Codling Moth (Lepidoptera : Tortricidae) in Apple Orchards Treated with Sex Pheromone*.  
<https://academic.oup.com/ee/article/36/1/157/496071>
- Koboldt, D. C., Chen, K., Wylie, T., Larson, D. E., McLellan, M. D., Mardis, E. R., Weinstock, G. M., Wilson, R. K., & Ding, L. (2009). VarScan : Variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics*, 25(17), 2283-2285.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp373>
- Koboldt, D. C., Zhang, Q., Larson, D. E., Shen, D., McLellan, M. D., Lin, L., Miller, C. A., Mardis, E. R., Ding, L., & Wilson, R. K. (2012). VarScan 2 : Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research*, 22(3), 568-576.  
<https://doi.org/10.1101/gr.129684.111>
- Kofler, R., Pandey, R. V., & Schlotterer, C. (2011). PoPoolation2 : Identifying differentiation between populations using sequencing of pooled DNA samples (Pool-Seq). *Bioinformatics*, 27(24), 3435-3436. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr589>
- Kofler, R., & Schlötterer, C. (2014). A Guide for the Design of Evolve and Resequencing Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 31(2), 474-483. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst221>
- Krueger, F., James, F., Ewels, P., Afyounian, E., Weinstein, M., Schuster-Boeckler, B., Hulselmans, G., & Sclamons. (2015). *TrimGalore* (0.6.5) [Logiciel]. Zenodo.  
<https://doi.org/10.5281/ZENODO.5127898>

- Le Goff, G., Boundy, S., Daborn, P. J., Yen, J. L., Sofer, L., Lind, R., Sabourault, C., Madi-Ravazzi, L., & ffrench-Constant, R. H. (2003). Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *33*(7), 701-708.  
[https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00064-X)
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, *25*(16), 2078-2079.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2007). Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, *52*(1), 231-253.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>
- Li, X., Zhu, B., Gao, X., & Liang, P. (2017). Over-expression of UDP-glycosyltransferase gene UGT2B17 is involved in chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Management Science*, *73*(7), 1402-1409. <https://doi.org/10.1002/ps.4469>
- Liu, J., Yang, X., & Zhang, Y. (2014). Characterization of a lambda-cyhalothrin metabolizing glutathione S-transferase CpGSTd1 from *Cydia pomonella* (L.). *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(21), 8947-8962. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5786-4>
- Long, A., Liti, G., Luptak, A., & Tenaillon, O. (2015). Elucidating the molecular architecture of adaptation via evolve and resequence experiments. *Nature reviews. Genetics*, *16*(10), 567-582. <https://doi.org/10.1038/nrg3937>
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). Chapter Two—The Evolution of Fungicide Resistance. In S. Sariaslani & G. M. Gadd (Éds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 90, p. 29-92). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.001>
- Malhat, F., Abdallah, H., & Hegazy, I. (2012). Dissipation of Chlorantraniliprole in Tomato Fruits and Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *88*(3), 349-351.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-011-0465-y>

- Mani, E., & Wildbolz, Th. (1977). The dispersal of male codling moths (*Laspeyresia pomonella* L.) in the Upper Rhine Valley. *Zeitschrift Für Angewandte Entomologie*, 83(1-4), 161-168.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.1977.tb02386.x>
- Martins, N. E., Faria, V. G., Nolte, V., Schlötterer, C., Teixeira, L., Sucena, É., & Magalhães, S. (2014). Host adaptation to viruses relies on few genes with different cross-resistance properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), 5938-5943.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1400378111>
- Matsumura, F. (2010). Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects : A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(2), 133-139.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.10.001>
- Melander, A. L. (1914). Can insects become resistant to sprays? *Journal of Economic Entomology*, 7(2), 167-173.
- Messer, P. W., & Petrov, D. A. (2013). Population genomics of rapid adaptation by soft selective sweeps. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(11), 659-669.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.08.003>
- Nadeau, N. J., & Jiggins, C. D. (2010). A golden age for evolutionary genetics? Genomic studies of adaptation in natural populations. *Trends in Genetics: TIG*, 26(11), 484-492.  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.08.004>
- Nauen, R., Stumpf, N., & Elbert, A. (2002). Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q-type *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae). *Pest Management Science*, 58(9), 868-875. <https://doi.org/10.1002/ps.557>
- Nelson, D. R., Goldstone, J. V., & Stegeman, J. J. (2013). The cytochrome P450 genesis locus : The origin and evolution of animal cytochrome P450s. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612), 20120474. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0474>

- Nikou, D., Ranson, H., & Hemingway, J. (2003). An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Gene*, *318*, 91-102. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00763-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00763-7)
- Oakeshott, J. G., Claudianos, C., Campbell, P. M., Newcomb, R. D., & Russell, R. J. (2005). Biochemical Genetics and Genomics of Insect Esterases. In *Comprehensive Molecular Insect Science* (p. 309-381). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-44-451924-6/00073-9>
- Oakeshott, J. G., Home, I., Sutherland, T. D., & Russell, R. J. (2003). The genomics of insecticide resistance. *Genome Biology*, *4*(1), 202. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-1-202>
- OMS. (1992). *Résistance des vecteurs aux pesticides* (Rapport technique 818; Rapports du Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle). OMS.
- Orozco-terWengel, P., Kapun, M., Nolte, V., Kofler, R., Flatt, T., & Schlötterer, C. (2012). Adaptation of *Drosophila* to a novel laboratory environment reveals temporally heterogeneous trajectories of selected alleles. *Molecular Ecology*, *21*(20), 4931-4941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05673.x>
- Palumbi, S. R. (2001). Humans as the World's Greatest Evolutionary Force. *Science*, *293*(5536), 1786-1790. <https://doi.org/10.1126/science.293.5536.1786>
- Pavlidis, N., Vontas, J., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.007>
- Pélissié, B., Chen, Y. H., Cohen, Z. P., Crossley, M. S., Hawthorne, D. J., Izzo, V., & Schoville, S. D. (2021). *Genome resequencing reveals rapid, repeated evolution in the Colorado potato beetle, Leptinotarsa decemlineata* [Preprint]. *Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1101/2021.02.09.430453>
- Peng, Y., Zhao, J., Sun, Y., Wan, P., Hu, Y., Luo, G., Qin, W., & Huang, S. (2021). Insights into chlorantraniliprole resistance of *Chilo suppressalis* : Expression profiles of ATP-binding

- cassette transporter genes in strains ranging from low- to high-level resistance. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 24(2), 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.02.006>
- Pignatelli, P., Ingham, V. A., Balabanidou, V., Vontas, J., Lycett, G., & Ranson, H. (2018). The *Anopheles gambiae* ATP-binding cassette transporter family : Phylogenetic analysis and tissue localization provide clues on function and role in insecticide resistance: *Anopheles gambiae ABC transporters*. *Insect Molecular Biology*, 27(1), 110-122. <https://doi.org/10.1111/imb.12351>
- Pons, S., Riedl, H., & Avilla, J. (1999). Toxicity of the Ecdysone Agonist Tebufenozide to Codling Moth (Lepidoptera : Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, 92(6), 1344-1351. <https://doi.org/10.1093/jee/92.6.1344>
- Qiu, Y., Tittiger, C., Wicker-Thomas, C., Le Goff, G., Young, S., Wajnberg, E., Fricaux, T., Taquet, N., Blomquist, G. J., & Feyereisen, R. (2012). An insect-specific P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), 14858-14863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208650109>
- R4P Network. (2018). *Universal classification of PPPs / Classification universelle des PPP*. <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/UBHR5>
- R4P Network. (2016). Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection. *Trends in Plant Science*, 21(10), 834-853. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.006>
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortelli, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V., Unger, M. F., Collins, F. H., & Feyereisen, R. (2002). Evolution of Supergene Families Associated with Insecticide Resistance. *Science*, 298(5591), 179-181. <https://doi.org/10.1126/science.1076781>
- Remigi, P., Masson-Boivin, C., & Rocha, E. P. C. (2019). Experimental Evolution as a Tool to Investigate Natural Processes and Molecular Functions. *Trends in Microbiology*, 27(7), 623-634. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.02.003>



- Reuveny, H., & Cohen, E. (2004). Resistance of the codling moth *Cydia pomonella* (L.) (Lep., Tortricidae) to pesticides in Israel. *Journal of Applied Entomology*, *128*(9-10), 645-651.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2004.00901.x>
- Rewitz, K. F., Styriehave, B., Løbner-Olesen, A., & Andersen, O. (2006). Marine invertebrate cytochrome P450 : Emerging insights from vertebrate and insect analogies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *143*(4), 363-381.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.04.001>
- Reyes, M., Franck, P., Charmillot, P.-J., Ioriatti, C., Olivares, J., Pasqualini, E., & Sauphanor, B. (2007). Diversity of insecticide resistance mechanisms and spectrum in European populations of the codling moth, *Cydia pomonella*. *Pest Management Science*, *63*(9), 890-902.  
<https://doi.org/10.1002/ps.1421>
- Reyes, M., Franck, P., Olivares, J., Margaritopoulos, J., Knight, A., & Sauphanor, B. (2009). Worldwide variability of insecticide resistance mechanisms in the codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera : Tortricidae). *Bulletin of Entomological Research*, *99*(4), 359-369.  
<https://doi.org/10.1017/S0007485308006366>
- Reyes, M., & Sauphanor, B. (2008). Resistance monitoring in codling moth : A need for standardization. *Pest Management Science*, *64*(9), 945-953. <https://doi.org/10.1002/ps.1588>
- Ritz, C. (2020). *Dose-response analysis using R*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR : A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, *26*(1), 139-140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rodríguez, M. A., Bosch, D., Sauphanor, B., & Avilla, J. (2010). Susceptibility to Organophosphate Insecticides and Activity of Detoxifying Enzymes in Spanish Populations of *Cydia pomonella* (Lepidoptera : Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*, *103*(2), 482-491.  
<https://doi.org/10.1603/EC09249>

- Rostant, W. G., Wedell, N., & Hosken, D. J. (2012). Chapter 2—Transposable Elements and Insecticide Resistance. In S. F. Goodwin, T. Friedmann, & J. C. Dunlap (Éds.), *Advances in Genetics* (Vol. 78, p. 169-201). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394394-1.00002-X>
- Roush, R. T., & Daly, J. C. (1990). The Role of Population Genetics in Resistance Research and Management. In R. T. Roush & B. E. Tabashnik (Éds.), *Pesticide Resistance in Arthropods* (p. 97-152). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0_5)
- Roush, R. T., & Tabashnik, B. E. (Éds.). (1990). *Pesticide Resistance in Arthropods*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0>
- Russell, R. J., Scott, C., Jackson, C. J., Pandey, R., Pandey, G., Taylor, M. C., Coppin, C. W., Liu, J.-W., & Oakshott, J. G. (2011). The evolution of new enzyme function : Lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. *Evolutionary Applications*, 4(2), 225-248. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00175.x>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24, 104-108.
- Sauer, A. J., Schulze-Bopp, S., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., & Jehle, J. A. (2017). A Third Type of Resistance to *Cydia pomonella* Granulovirus in Codling Moths Shows a Mixed Z-Linked and Autosomal Inheritance Pattern. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(17), e01036-17, e01036-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01036-17>
- Schlötterer, C., Kofler, R., Versace, E., Tobler, R., & Franssen, S. U. (2015). Combining experimental evolution with next-generation sequencing : A powerful tool to study adaptation from standing genetic variation. *Heredity*, 114(5), 431-440. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.86>
- Schlötterer, C., Tobler, R., Kofler, R., & Nolte, V. (2014). Sequencing pools of individuals—Mining genome-wide polymorphism data without big funding. *Nature Reviews Genetics*, 15(11), 749-763. <https://doi.org/10.1038/nrg3803>
- Scott, J. G. (2017). Evolution of resistance to pyrethroid insecticides in *Musca domestica*. *Pest Management Science*, 73(4), 716-722. <https://doi.org/10.1002/ps.4328>

- Seong, K. M., Sun, W., Clark, J. M., & Pittendrigh, B. R. (2016). Splice form variant and amino acid changes in MDR49 confers DDT resistance in transgenic *Drosophila*. *Scientific Reports*, *6*(1), 23355. <https://doi.org/10.1038/srep23355>
- Shan, J., Sun, X., Li, R., Zhu, B., Liang, P., & Gao, X. (2021). Identification of ABCG transporter genes associated with chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Management Science*, *77*(7), 3491-3499. <https://doi.org/10.1002/ps.6402>
- Siegfried, B. D., Swanson, J. J., & Devonshire, A. L. (1997). Immunological Detection of Greenbug (*Schizaphis graminum*) Esterases Associated with Resistance to Organophosphate Insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *57*(3), 165-170. <https://doi.org/10.1006/pest.1997.2274>
- Siegwart, M., & Maugin, S. (2013). *Résistance du carpocapse des pommes et des poires (Cydia pomonella) au virus de la granulose—Plan de surveillance 2013*.
- Slate, J. (2013). From beavis to beak color : A simulation study to examine how much QTL mapping can reveal about the genetic architecture of quantitative traits. *Evolution*, *67*(5), 1251-1262. <https://doi.org/10.1111/evo.12060>
- Soderlund, D. M. (2008). Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science*, *64*(6), 610-616. <https://doi.org/10.1002/ps.1574>
- Soderlund, D. M., & Bloomquist, J. R. (1990). Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. In R. T. Roush & B. E. Tabashnik (Éds.), *Pesticide Resistance in Arthropods* (p. 58-96). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0_4)
- Soleño, J., Parra-Morales, L. B., Cichón, L., Garrido, S., Guiñazú, N., & Montagna, C. M. (2020). Occurrence of pyrethroid resistance mutation in *Cydia pomonella* (Lepidoptera : Tortricidae) throughout Argentina. *Bulletin of Entomological Research*, *110*(2), 201-206. <https://doi.org/10.1017/S0007485319000439>

- Somers, J., Luong, H. N. B., Batterham, P., & Perry, T. (2018). Deletion of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene  $D\alpha 1$  confers insecticide resistance, but at what cost? *Fly*, *12*(1), 46-54.  
<https://doi.org/10.1080/19336934.2017.1396399>
- Song, Y., Endepols, S., Klemann, N., Richter, D., Matuschka, F.-R., Shih, C.-H., Nachman, M. W., & Kohn, M. H. (2011). Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice. *Current Biology: CB*, *21*(15), 1296-1301.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.043>
- Sparks, T. C., Dripps, J. E., Watson, G. B., & Paroonagian, D. (2012). Resistance and cross-resistance to the spinosyns – A review and analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *102*(1), 1-10.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.11.004>
- Sparks, T. C., & Nauen, R. (2015). IRAC : Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *121*, 122-128.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Stinchcombe, J. R., & Hoekstra, H. E. (2008). Combining population genomics and quantitative genetics : Finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity*, *100*(2), 158-170. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800937>
- Stoeckli, S., Hirschi, M., Spirig, C., Calanca, P., Rotach, M. W., & Samietz, J. (2012). Impact of Climate Change on Voltinism and Prospective Diapause Induction of a Global Pest Insect – *Cydia pomonella* (L.). *PLOS ONE*, *7*(4), e35723. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035723>
- Stone, C. M., Jackson, B. T., & Foster, W. A. (2012). Effects of bed net use, female size, and plant abundance on the first meal choice (blood vs sugar) of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal*, *11*(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-3>
- Tabashnik, B. E. (1990). Modeling and Evaluation of Resistance Management Tactics. In R. T. Roush & B. E. Tabashnik (Éds.), *Pesticide Resistance in Arthropods* (p. 153-182). Springer US.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6429-0_6)

- Tabata, J., Noguchi, H., Kainoh, Y., Mochizuki, F., & Sugie, H. (2007). Behavioral response to sex pheromone-component blends in the mating disruption-resistant strain of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* Yasuda (Lepidoptera : Tortricidae), and its mode of inheritance. *Applied Entomology and Zoology*, 42(4), 675-683. <https://doi.org/10.1303/aez.2007.675>
- Thaler, R., Brandstätter, A., Meraner, A., Chabicovski, M., Parson, W., Zelger, R., Dalla Via, J., & Dallinger, R. (2008). Molecular phylogeny and population structure of the codling moth (*Cydia pomonella*) in Central Europe : II. AFLP analysis reflects human-aided local adaptation of a global pest species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3), 838-849. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.05.027>
- Tohnishi, M., Nakao, H., Furuya, T., Seo, A., Kodama, H., Tsubata, K., Fujioka, S., Kodama, H., Hirooka, T., & Nishimatsu, T. (2005). Flubendiamide, a Novel Insecticide Highly Active against Lepidopterous Insect Pests. *Journal of Pesticide Science*, 30(4), 354-360. <https://doi.org/10.1584/jpestics.30.354>
- Turner, T. L., Stewart, A. D., Fields, A. T., Rice, W. R., & Tarone, A. M. (2011). Population-Based Resequencing of Experimentally Evolved Populations Reveals the Genetic Basis of Body Size Variation in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 7(3), e1001336. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001336>
- Ullrich, V., & Weber, P. (1972). The O-Dealkylation of 7-Ethoxycoumarin by Liver Microsomes. *A Direct Fluorometric Test*. 353(2), 1171-1177. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1972.353.2.1171>
- Van Leeuwen, T., Dermauw, W., Mavridis, K., & Vontas, J. (2020). Significance and interpretation of molecular diagnostics for insecticide resistance management of agricultural pests. *Current Opinion in Insect Science*, 39, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.03.006>
- Voudouris, C. Ch., Sauphanor, B., Franck, P., Reyes, M., Mamuris, Z., Tsitsipis, J. A., Vontas, J., & Margaritopoulos, J. T. (2011). Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia*

- pomonella (Lepidoptera : Tortricidae) from Greece. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3), 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.04.006>
- Walsh, S. B., Dolden, T. A., Moores, G. D., Kristensen, M., Lewis, T., Devonshire, A. L., & Williamson, M. S. (2001). Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochemical Journal*, 359(Pt 1), 175-181.
- Wan, F., Yin, C., Tang, R., Chen, M., Wu, Q., Huang, C., Qian, W., Rota-Stabelli, O., Yang, N., Wang, S., Wang, G., Zhang, G., Guo, J., Gu, L. (Aloy), Chen, L., Xing, L., Xi, Y., Liu, F., Lin, K., ... Li, F. (2019). A chromosome-level genome assembly of *Cydia pomonella* provides insights into chemical ecology and insecticide resistance. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12175-9>
- Weetman, D., Wilding, C. S., Neafsey, D. E., Müller, P., Ochomo, E., Isaacs, A. T., Steen, K., Rippon, E. J., Morgan, J. C., Mawejje, H. D., Rigden, D. J., Okedi, L. M., & Donnelly, M. J. (2018). Candidate-gene based GWAS identifies reproducible DNA markers for metabolic pyrethroid resistance from standing genetic variation in East African *Anopheles gambiae*. *Scientific Reports*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21265-5>
- Wei, Z.-H., Liu, M., Hu, C., & Yang, X.-Q. (2020). Overexpression of Glutathione S-Transferase Genes in Field  $\lambda$ -Cyhalothrin-Resistant Population of *Cydia pomonella* : Reference Gene Selection and Expression Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(21), 5825-5834. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01367>
- Weissling, T. J., & Knight, A. L. (1995). Vertical distribution of codling moth adults in pheromone-treated and untreated plots. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 77(3), 271-275. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1995.tb02324.x>
- Wilding, C. S. (2018). Regulating resistance : CncC:Maf, antioxidant response elements and the overexpression of detoxification genes in insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science*, 27, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.04.006>

- Wilkinson, C. F. (1983). Role of Mixed-Function Oxidases in Insecticide Resistance. In G. P. Georgiou & T. Saito (Éds.), *Pest Resistance to Pesticides* (p. 175-205). Springer US.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4466-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-4466-7_7)
- Wybouw, N., Kosterlitz, O., Kurlavs, A. H., Bajda, S., Greenhalgh, R., Snoeck, S., Bui, H., Bryon, A., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., & Clark, R. M. (2019). Long-Term Population Studies Uncover the Genome Structure and Genetic Basis of Xenobiotic and Host Plant Adaptation in the Herbivore *Tetranychus urticae*. *Genetics*, *211*(4), 1409-1427.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.118.301803>
- Xu, L., Mei, Y., Liu, R., Chen, X., Li, D., & Wang, C. (2020). Transcriptome analysis of *Spodoptera litura* reveals the molecular mechanism to pyrethroids resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *169*, 104649. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104649>
- Yang, X.-Q., Wu, Z.-W., Zhang, Y.-L., & Barros-Parada, W. (2016). Toxicity of Six Insecticides on Codling Moth (Lepidoptera : Tortricidae) and Effect on Expression of Detoxification Genes. *Journal of Economic Entomology*, *109*(1), 320-326. <https://doi.org/10.1093/jee/tov297>
- Zalucki, M., & Furlong, M. (2017). Behavior as a mechanism of insecticide resistance : Evaluation of the evidence. *Current Opinion in Insect Science*, *21*, 19-25.  
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2017.05.006>
- Zhang, L., Khan, S. U., Akhtar, M. H., & Iverson, K. C. (1984). Persistence, degradation, and distribution of deltamethrin in an organic soil under laboratory conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *32*(6), 1207-1211. <https://doi.org/10.1021/jf00126a001>
- Zhang, Meng, X., Yang, Y., Li, H., Wang, X., Yang, B., Zhang, J., Li, C., Millar, N. S., & Liu, Z. (2016). Synergistic and compensatory effects of two point mutations conferring target-site resistance to fipronil in the insect GABA receptor RDL. *Scientific Reports*, *6*(1), 32335.  
<https://doi.org/10.1038/srep32335>
- Zhou, X., Scharf, M. E., Meinke, L. J., Chandler, L. D., & Siegfried, B. D. (2005). Immunological assessment of an insecticide resistance-associated esterase in the Western corn rootworm.

*Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 58(3), 157-165.

<https://doi.org/10.1002/arch.20040>

Zhu, Xiao, K.-R., He, S.-Q., Gui, F.-R., & Li, L. (2021). Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Cuticular Protein Genes Responding to Different Insecticides in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Insects*, 12(11), 997. <https://doi.org/10.3390/insects12110997>

Zimmer, C. T., Garrood, W. T., Singh, K. S., Randall, E., Lueke, B., Gutbrod, O., Matthiesen, S., Kohler, M., Nauen, R., Davies, T. G. E., & Bass, C. (2018). Neofunctionalization of Duplicated P450 Genes Drives the Evolution of Insecticide Resistance in the Brown Planthopper. *Current Biology*, 28(2), 268-274.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.060>



## Communications associées à ce travail

### Communications orales :

Idier M., « Characterization of the genetic basis of (bio)pesticide resistance in *Cydia pomonella* (L.) for high-throughput molecular detection in landscapes » Journées Scientifiques et Doctorales de l'ANSES (JDSA). 18 & 19 Octobre 2022. ANSES Maisons-Alfort.

Idier, M., Siegwart, M., Barrès, B., Lavigne C., and Gauffre B. « Characterization and detection of (bio)pesticide resistance in *Cydia pomonella* (L.): a genomic approach » 11<sup>th</sup> international workshop on molecular biology and genetics of the Lepidoptera. 21-27 Août 2022. Kolympari, Grèce.

Idier M., « Un outil performant pour gérer les résistances du carpocapse à l'échelle du paysage » Journée carpocapse. 02 Février 2022, INRAE Avignon.

Idier M., « Caractérisation des bases génétiques des résistances non-liées à la cible chez le carpocapse des pommes » Colloque du Réseau 'Adaptation à l'environnement chez les Lépidoptères' (ADALEP) 2020. 6 & 7 Octobre 2020. CNRS Montpellier.

Idier M., « Gestion du carpocapse des pommes : développement d'un outil pour gérer ses résistances à l'échelle du paysage » Journée carpocapse. 26 Novembre 2019, INRAE Avignon.

### Posters :

Idier M., « Characterization of the genetic basis of resistance to (bio)pesticides in *Cydia pomonella* » Journées Scientifiques et Doctorales de l'ANSES (JDSA) 21 & 22 Septembre 2021.

Idier, M., Siegwart, M., Barrès, B., Lavigne C., and Gauffre B. (2022). « Characterization of the genetic basis of resistance to (bio)pesticides in *Cydia pomonella* (L.) » 18<sup>th</sup> Congress of the European Society for Evolutionary Biology (ESEB). 14-19 Août 2022. Prague, République Tchèque.

## Équipe d'encadrement

Benoit Barrès, Chercheur, ANSES USC CASPER

Bertrand Gauffre, Chargé de recherche, INRAE UR PSH

Claire Lavigne, Directrice de recherche, INRAE UR PSH

Myriam Siegwart, Ingénieure d'étude, INRAE UR PSH