



HAL
open science

**IDENTIFICATION ET CARACTERISATION
MOLECULAIRE DE GENES IMPLIQUES DANS LA
RECEPTION PHEROMONALE PERIPHERIQUE ET
MISE AU POINT D'UN OUTIL D'ANALYSE
FONCTIONNELLE CHEZ UN LEPIDOPTERE: LE
VER A SOIE, BOMBYX MORI**

Julien Pelletier

► **To cite this version:**

Julien Pelletier. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DE GENES IMPLIQUES DANS LA RECEPTION PHEROMONALE PERIPHERIQUE ET MISE AU POINT D'UN OUTIL D'ANALYSE FONCTIONNELLE CHEZ UN LEPIDOPTERE: LE VER A SOIE, BOMBYX MORI. Biodiversité. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT: 2007PA066485. tel-00811539

HAL Id: tel-00811539

<https://theses.hal.science/tel-00811539>

Submitted on 10 Apr 2013

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité : Diversité du vivant

Présentée par

Julien PELLETIER

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

**IDENTIFICATION ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DE
GENES IMPLIQUES DANS LA RECEPTION PHEROMONALE
PERIPHERIQUE ET MISE AU POINT D'UN OUTIL D'ANALYSE
FONCTIONNELLE CHEZ UN LEPIDOPTERE : LE VER A SOIE,
*BOMBYX MORI***

Le 12 Décembre 2007

JURY :

M. Mme	Pr. Pierre COUBLE	Rapporteur
	Pr. Roland SALESSE	Rapporteur
	Pr. Jacques CASTANET	Examineur
	Dr. Corinne ROYER	Examineur
	Dr. Emmanuelle JACQUIN-JOLY	Co-encadrante de thèse
	Pr. Martine MAIBECHE	Co-encadrante de thèse
	Pr. Patrick PORCHERON	Directeur de thèse

Avant-propos

Je souhaite exprimer dans cet avant-propos toute ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à l'accomplissement du travail de recherche présenté dans ce mémoire.

Je tiens d'abord à remercier celui sans qui tout cela n'aurait pas été possible, mon directeur de thèse, M. Patrick Porcheron, qui m'a guidé, après une année de DEA passionnante, vers l'équipe de Réception, Transduction et Modulation, au sein de laquelle j'ai passé trois années de doctorat inoubliables.

Ensuite, je tiens, bien sûr, à adresser toute ma gratitude aux personnes à l'origine de ce travail, qui m'ont accueilli puis encadré pendant ces trois années, Emmanuelle Jacquin-Joly et Martine Maibèche-Coisne. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre confiance, votre soutien, et votre gentillesse, mais aussi et surtout pour toutes les choses que j'ai pu apprendre à vos côtés, au niveau scientifique, mais aussi humain, et qui devraient me servir tout au long de ma carrière scientifique et de ma vie future.

J'ai également pu bénéficier, à Versailles comme à Paris, d'un environnement professionnel stimulant et de grande qualité, essentiel à la bonne réalisation de ce travail. A ce titre, je remercie tous mes collègues de l'UMR PISC, chercheurs titulaires ou doctorants, pour leur gentillesse, leur énergie et leur bonne humeur. En particulier, je tiens à remercier chaleureusement mes collaborateurs Corinne Royer, de l'Unité Nationale Séricicole, et Philippe Lucas, pour leur apport inestimable dans la mise au point du projet d'analyse fonctionnelle par la transgénèse, ainsi que Jérôme Golebiowski pour les modélisations. Je remercie également Marie-Christine François, Françoise Bozzolan et Marthe Solvar, pour leur aide technique, très précieuse en de maintes occasions, ainsi que Sabine Fillinger et Anne-Sophie Walker, de l'équipe fongicides, pour m'avoir permis d'utiliser leurs appareils de temps à autre, en temps de crise. J'ai aussi beaucoup apprécié l'excellente entente entre les doctorants des différentes équipes de l'UMR, et je tiens à leur souhaiter à tous et à toutes beaucoup de chance pour l'avenir. Ce fut un réel plaisir et un privilège pour moi de travailler avec toutes ces personnes durant ces trois années.

Je tiens enfin à remercier sincèrement les membres du jury : Pierre Couble et Roland Salesse, pour avoir accepté le rôle de rapporteur du travail présenté dans ce mémoire, et également Jacques Castanet, pour avoir accepté de l'examiner.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	9
Introduction générale	11
PREMIERE PARTIE. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	15
Chapitre I. Généralités sur le modèle, outils génomiques et biotechnologiques	17
I.1. Le ver à soie, <i>Bombyx mori</i> , quelques éléments de biologie.....	17
I.2. Ressources génomiques disponibles	18
I.3. La transgénèse	20
I.4. Le système UAS/Gal4	21
Chapitre II. Le système phéromonal, composition de la phéromone et comportements associés	22
II.1. Généralités chez les lépidoptères.....	22
II.2. Le cas de <i>B. mori</i>	23
Chapitre III. Organisation générale du système olfactif.....	25
III.1. Le système olfactif périphérique : structure et organisation.....	25
III.2. Profil de réponse électrophysiologique des NRO de la sensille trichoïde longue mâle et rôle du Bal .	27
III.3. Profil de réponse électrophysiologique des NRO de la sensille trichoïde longue femelle	28
III.4. Le système olfactif central : structure et organisation.....	29
Chapitre IV. Les bases moléculaires de la réception olfactive périphérique	31
IV.1. Le transport des odeurs par les Odorant-Binding Proteins (OBP)	31
IV.1.1. Les Chemosensory Proteins (CSP)	31
IV.1.2. Les protéines de liaison aux odeurs : PBP, GOBP et ABPX	32
IV.1.2.1. Expression différentielle des OBP chez le ver à soie	33
IV.1.2.2. Structure et fonction de BmPBP1	34
IV.1.2.3. Sélectivité de BmPBP1 vis à vis du Bol et du Bal	36
IV.1.2.4. Rôle des OBP dans l'activation des RO	37
IV.1.2.5. Rôle potentiel de scavenger des OBP	37
IV.2. La détection des odeurs par leur interaction avec les récepteurs olfactifs (RO)	38
IV.2.1. La découverte des RO de vertébrés puis d'insectes	38
IV.2.2. Les récepteurs phéromonaux (RP) d'insectes	40
IV.3. Un rôle central des Sensory Neuron Membrane Proteins (SNMP) dans l'olfaction, mais lequel ?	43
IV.3.1. Les SNMP, une deuxième famille de récepteurs des NRO.....	43
IV.3.2. Une fonction olfactive qui reste à déterminer	43
IV.4. La dégradation et/ou l'inactivation du signal chimique par les Odorant-Degrading Enzymes (ODE)	45
IV.4.1. Une diversité d'activités enzymatiques de dégradation antennaires	45
IV.4.2. Dégradation de la phéromone chez le ver à soie	46
Chapitre V. L'apport du modèle insecte dans l'étude de la réception olfactive	48
Chapitre VI. La spécificité de la réception olfactive : implication des acteurs moléculaires et dynamique temporelle	49
Chapitre VII. Conclusion de la première partie	50

Objectifs de mon travail de thèse	55
DEUXIEME PARTIE. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION MOLECULAIRE DE GENES IMPLIQUES DANS LA RECEPTION PHEROMONALE PERIPHERIQUE CHEZ LE VER A SOIE, <i>Bombyx mori</i>.....	
Chapitre I. Matériel et méthodes.....	59
I.1. Bioinformatique et analyse des séquences génomiques.....	59
I.2. Préparation des insectes et prélèvement des tissus	60
I.3. Extraction des ARN totaux et préparation des ADNc	61
I.4. Amplifications PCR, clonage et séquençage des gènes candidats	61
I.5. Etude des profils d'expression dans différents tissus et au cours du développement par RT-PCR et Northern-blot.....	61
I.6. Etude de la localisation sensillaire par hybridation <i>in situ</i> (HIS).....	62
I.7. Modélisation des structures tridimensionnelles de BmPBP2 et BmPBP3	63
I.8. Prédiction théorique d'affinité de BmPBP1 envers le Bol et le Bal	63
Chapitre II. Deux nouvelles PBP exprimées dans les antennes mâles et femelles.....	65
II.1. Introduction et contexte.....	65
II.2. Résultats et Discussions	67
II.2.1. Identification de deux nouvelles PBP : organisation génomique, structure génétique et évolution	67
II.2.2. BmPBP2 et BmPBP3 sont exprimées de façon différentielle dans les antennes mâles et femelles	70
II.2.3. Modélisation des structures tridimensionnelles et prédiction théorique d'affinité	74
II.2.4. BmPBP2 et BmPBP3 sont fortement exprimées dans les antennes femelles	76
II.2.5 BmPBP2 est faiblement exprimé au niveau des appendices locomoteurs.....	77
II.3. Conclusion et perspectives	79
Chapitre III. Une nouvelle SNMP au profil d'expression particulier.....	81
III.1. Introduction et contexte.....	81
III.2. Résultats et discussions	83
III.2.1. Identification d'un nouveau gène codant pour une SNMP.....	83
III.2.2. Deux sous-familles de SNMP sont présentes chez le ver à soie.....	85
III.2.3. <i>BmSNMP2</i> , la première SNMP de lépidoptère au profil d'expression ubiquitaire.....	86
III.2.4. Rôles potentiels de BmSNMP1 et BmSNMP2	87
III.3. Conclusion et perspectives	89
Chapitre IV. Deux AOX antennaires potentiellement impliquées dans la dégradation de la phéromone	91
IV.1. Introduction et contexte	91
IV.2. Conclusion et perspectives.....	93
Article de publication, Gene 2007.....	95
TROISIEME PARTIE. MISE AU POINT D'UN OUTIL D'ANALYSE FONCTIONNELLE <i>IN VIVO</i> PAR LA TECHNIQUE DE TRANSGENESE CHEZ LE VER A SOIE	
Chapitre I. Introduction et contexte	109

Chapitre II. Matériel et méthodes	113
II.1. Construction des vecteurs de transformation.....	113
II.1.1. PigP25i1IL2-3P3GFP (PigP25).....	113
II.1.2. Pig-pA3OR1-3P3GFP	116
II.1.3. Pig-UASOR1-3P3GFP	117
II.2. Outils moléculaires utilisés pour la construction des vecteurs	118
II.3. Injections des constructions transgéniques.....	118
II.4. Estimation de l'expression du transgène OR1 dans une antenne.....	119
II.5. Comparaison des lignées transgéniques par PCR.....	119
II.6. Quantification de l'expression du transgène OR1 sur gel	120
II.7. Caractérisation du site d'expression du promoteur pA3 dans les NRO.....	120
II.8. Analyse fonctionnelle par enregistrements EAG à différentes doses de Bol.....	121
Chapitre III. Résultats et discussions.....	123
III.1. Injection des vecteurs et création des lignées transgéniques.....	123
III.2. Expression relative d'OR1 entre lignées transgéniques et avec mâles sauvages	125
III.3. Réponses électrophysiologiques des femelles transgéniques à la phéromone	127
III.3.1. Résultats obtenus en EAG.....	127
III.3.2. Effet du contexte femelle	128
III.3.3. Effet du promoteur pA3	128
Chapitre IV. Conclusion et perspectives.....	131
Conclusion générale et perspectives.....	133
Annexes, articles de publications en co-auteurs et congrès.....	137
Références bibliographiques.....	141
Références bibliographiques.....	141
Résumé / Abstract.....	150

Liste des abréviations

A3 : gène de l'actine
ABPX : Antennal Binding Protein X
Ac : Acétate
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
AOX : Aldéhyde-Oxidase
ARNi : Acide RiboNucléique interférence
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
pb : paire de bases
Bol : Bombykol
Bal : Bombykal
BGF : Bgi Gene Finder
BGI : Beijing Genomics Institute
Bm : *Bombyx mori*
CMG : Complexe Macro Glomérulaire
CSP : ChemoSensory Protein
cVA : cis-vaccenyl acétate
Dig : Digoxigenin
DMH : 2,6-diméthyl-5-hepten-2-ol
DMSO : diméthyl-sulfoxyde
EAG : ElectroAntennoGraphie
EST : Expressed Sequence Tag
GFP : Green Fluorescent Protein
GOBP : General Odorant-Binding Protein
HIS : Hybridation *in-situ*
linalool : 3,7-diméthyl-1,6-octadiène-3-ol
NCBI : National Center for Biotechnology Information
NRO : Neurone Récepteur Olfactif
OBP : Odorant-Binding Protein
ODE : Odorant-Degrading Enzyme
pA3 : promoteur de l'actine
pI : point Isoélectrique
PBP : Pheromone-Binding Protein
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDE : Pheromone-Degrading Enzyme
RG : Récepteurs Gustatif
RO : Récepteur Olfactif
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RP : Récepteur Pheromonal
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
RT-PCR : Reverse Transcription-PCR
SGRP : Silkworm Genome Research Program
SNMP : Sensory Neuron Membrane Protein
SSR : Single Sensillum Recording

Tous les gènes dans ce mémoire sont écrits en *italique*

Introduction générale

L'olfaction ou la détection de substances chimiques volatiles présentes dans l'environnement constitue une modalité sensorielle fondamentale chez la plupart des espèces, des bactéries jusqu'aux mammifères. L'étude des mécanismes moléculaires et physiologiques à la base de cette fonction biologique constitue un domaine de recherche passionnant, en perpétuelle évolution depuis deux décennies, aussi bien chez les vertébrés que chez les non-vertébrés. La comparaison de leurs systèmes olfactifs respectifs montre d'ailleurs des similitudes évidentes, de par la nature des acteurs moléculaires impliqués jusqu'à l'organisation des structures cellulaires et cérébrales [1] [2]. Les insectes, notamment nocturnes, qui décodent leur environnement principalement par les informations odorantes, possèdent un système olfactif relativement simple par rapport aux vertébrés et un organe périphérique, l'antenne, particulièrement accessible à l'expérimentateur. Cela rend ces animaux très intéressants pour l'étude de l'olfaction. La communication chimique chez les insectes et en particulier la communication phéromonale sexuelle, menant au comportement reproducteur, sont étudiées depuis maintenant près de cinquante ans. Chez les lépidoptères nocturnes, comme chez le modèle de cette étude, le ver à soie *Bombyx mori*, cette communication phéromonale possède une sensibilité et une spécificité remarquable, et engendre un comportement typique [3]. C'est généralement la femelle qui émet une phéromone, c'est à dire un mélange complexe de composés odorants spécifique de l'espèce, pour attirer le mâle conspécifique et ainsi aboutir à la reproduction. Ces mélanges phéromonaux, propres à chaque espèce, sont maintenant connus chez de nombreux lépidoptères. Les phéromones sont ensuite perçues par les mâles au niveau de leurs antennes par le biais d'unités morphofonctionnelles appelées sensilles olfactives. Ces structures cuticulaires contiennent les neurones récepteurs olfactifs (NRO) dont les dendrites baignent dans un milieu aqueux particulier, la lymphe sensillaire, où vont se dérouler les événements périrécepteurs [3]. La communication phéromonale est si sensible que les mâles sont souvent capables de détecter les femelles de la même espèce sur des distances de plus d'un kilomètre. De plus, la spécificité de reconnaissance est si grande qu'une simple modification de la nature chimique d'une molécule (longueur de la chaîne carbonée ou position d'une double liaison) ou du ratio des différents constituants peut modifier radicalement le seuil de réponse comportemental du mâle à la phéromone, et ainsi perturber la reproduction [3].

La perception olfactive est un mécanisme physiologique se déroulant en deux étapes. D'abord, la réception olfactive périphérique, au niveau de l'antenne, permet la transformation de l'information chimique en message électrique. Ensuite, ce message électrique est transmis aux centres d'intégration du système nerveux central, où l'information est à nouveau traitée pour aboutir (ou non) au déclenchement d'un comportement. A l'échelle moléculaire, la réception olfactive périphérique est assurée par différents types de protéines impliquées séquentiellement dans trois grandes étapes [4] [5] [6]. Quand des molécules odorantes pénètrent dans une sensille olfactive, elles seraient d'abord prises en charge et transportées par des protéines de liaison aux odeurs (Odorant-Binding Proteins ; OBP) [7] jusqu'aux récepteurs olfactifs (RO) [8] [9] ancrés dans la membrane dendritique des NRO, et dont l'interaction avec l'odeur permet le déclenchement de la cascade de transduction olfactive. Cette réaction en chaîne va mener à l'ouverture de canaux ioniques, ce qui va assurer la transformation du signal chimique codé par l'odeur en un signal électrique. Enfin, dans un troisième temps, la terminaison du signal, étape importante dans la dynamique de la réception

olfactive, serait assurée par des enzymes de dégradation des odeurs (Odorant-Degrading Enzymes ; ODE) [4] [5] [6].

L'identification et la caractérisation moléculaire et fonctionnelle de ces différents éléments périphériques constituent un enjeu majeur pour l'équipe « Réception, Transduction et Modulation » de l'UMR « Physiologie de l'Insecte : Signalisation et Communication » dont l'objectif est d'évaluer la contribution respective de ces différentes classes de protéines dans la spécificité de la réception olfactive phéromonale chez des lépidoptères nocturnes, en appliquant une démarche intégrée combinant des approches bioinformatiques, moléculaires, biochimiques et physiologiques. Etudier l'olfaction chez un lépidoptère présente non seulement un intérêt fondamental, de par les similitudes qui existent entre les systèmes olfactifs de vertébrés et d'invertébrés, mais aussi appliqué. En effet, il faut savoir que de nombreuses espèces de lépidoptères nocturnes sont, à l'état larvaire, des ravageurs de culture qui sont responsables chaque année d'un manque à gagner colossal au niveau économique. L'étude du système de communication phéromonale et particulièrement des différentes protéines impliquées dans la spécificité de la réception périphérique pourrait donc aboutir à identifier des cibles potentielles de choix pour la mise au point dans le futur de nouvelles méthodes de lutte contre les insectes nuisibles, ravageurs de culture ou vecteurs de maladie.

Mon travail de thèse au sein de l'équipe de l'UMR PISC a consisté à identifier et à caractériser au niveau moléculaire des gènes potentiellement impliqués dans les différents événements de la réception olfactive et phéromonale, sur un modèle nouveau au laboratoire, le ver à soie *B. mori*. A l'échelle internationale, ce modèle est de longue date l'un des plus utilisés pour les recherches sur l'olfaction, la première phéromone ayant été identifiée chez cette espèce [10], et récemment son génome a été partiellement séquencé avec mise à disposition sur Internet des séquences correspondantes [11] [12]. J'ai porté au cours de ces trois années d'étude un intérêt particulier aux trois grandes familles de protéines impliquées dans la réception phéromonale périphérique : les Pheromone-Binding Proteins (PBP), une classe particulière d'OBP, les récepteurs phéromonaux (RP), une classe particulière de RO, et les Pheromone-Degrading Enzymes (PDE), une classe particulière d'ODE. Je me suis également intéressé aux Sensory Neuron Membrane Proteins (SNMP), une autre famille de récepteurs spécifiques des NRO dont la fonction est toujours inconnue. En parallèle, j'ai également développé sur ce modèle un outil biotechnologique novateur destiné à l'analyse fonctionnelle *in vivo* de gènes olfactifs basé sur la technique de transgénèse [13].

Je commencerai ce mémoire par une synthèse bibliographique qui présente l'état des connaissances actuelles sur la communication chimique chez les insectes et en particulier sur le modèle *B. mori*, dont la communication phéromonale intéresse les chercheurs depuis plus de cinquante ans. Je détaillerai ici ce qui est connu des bases moléculaires de la réception olfactive périphérique, les rôles identifiés des différentes protéines impliquées, ainsi que les nombreuses zones d'ombre qui subsistent sur la compréhension de ces mécanismes complexes.

Je présenterai ensuite mes résultats obtenus sur l'identification et la caractérisation moléculaire de plusieurs nouveaux acteurs potentiellement impliqués dans les mécanismes de réception odorante ou phéromonale chez le ver à soie, en particulier deux PBP aux profils

d'expression inattendus, deux ODE de la classe enzymatique des aldéhyde oxidases (AOX), et une SNMP, dont les rôles possibles seront discutés.

Enfin, je présenterai l'utilisation de la transgénèse comme outil d'analyse fonctionnelle *in vivo* de gènes olfactifs chez le ver à soie, ainsi que les données préliminaires obtenues avec un récepteur phéromonal. Cette approche ambitieuse, réellement novatrice chez un lépidoptère, a fourni des résultats contrastés qui seront discutés.

PREMIERE PARTIE. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

**Les bases de la communication chimique chez les insectes,
l'exemple du ver à soie, *Bombyx mori***

Chapitre I. Généralités sur le modèle, outils génomiques et biotechnologiques

I.1. Le ver à soie, *Bombyx mori*, quelques éléments de biologie

Je ne pouvais commencer cette introduction bibliographique sans écrire quelques mots sur le fabuleux papillon qui fut non seulement le support de mes recherches pendant trois ans, mais aussi un acteur important de l'histoire de l'humanité ainsi qu'un inestimable modèle pour l'étude de la biologie, la physiologie et la génétique des insectes. Originaire du nord de la Chine, le ver à soie *Bombyx mori* est un lépidoptère de la famille des Bombycidae (300 espèces environ) qui présente la particularité d'avoir été domestiqué depuis environ 5000 ans à partir de l'espèce sauvage *Bombyx mandarina* pour produire la soie [14]. Les précieuses fibres de soie utilisées dans l'industrie textile sont d'une importance commerciale considérable et proviennent des cocons fabriqués par les chenilles juste avant leur transformation en chrysalide. Le fil de soie mesure entre 300 et 1500 mètres de long, il est produit par des glandes spécialisées, dites séricigènes, et secrété par une filière située postérieurement au niveau de la partie antérieure de la chenille. Le ver à soie est une espèce monophage qui se nourrit exclusivement de feuilles de mûrier blanc (*Morus alba*), et qui supporte plutôt difficilement d'être nourri sur du milieu nutritif artificiel. Le cycle de vie de cette espèce comprend cinq stades larvaires au cours desquels les chenilles ne font que se nourrir, un stade chrysalide protégé par le cocon de soie et un stade adulte incapable de se nourrir et qui peut vivre une douzaine de jours environ (figure 1).

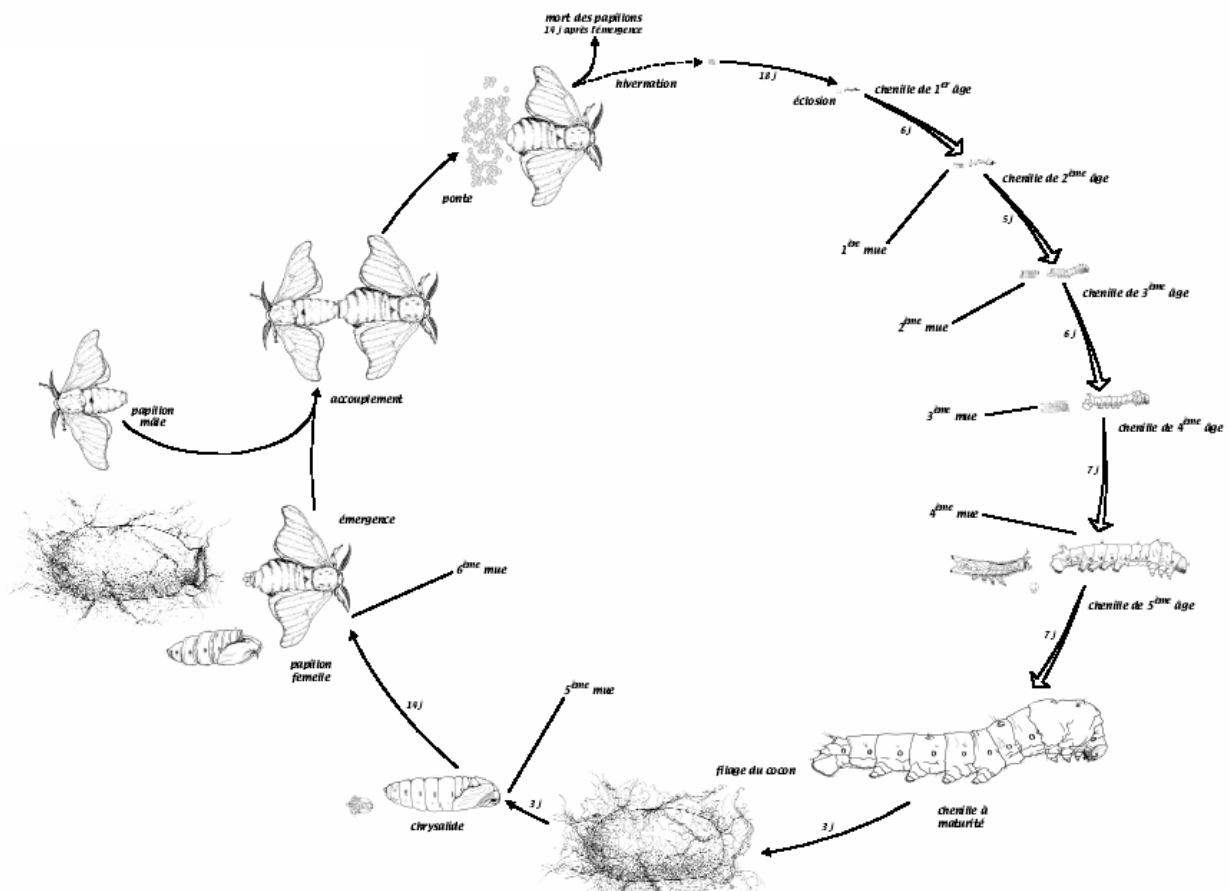


Figure 1. Cycle de développement du ver à soie *Bombyx mori* à 22°C. (D'après Internet : <http://imagesvt.free.fr/dessins/pdf/CycleBmori.pdf>)

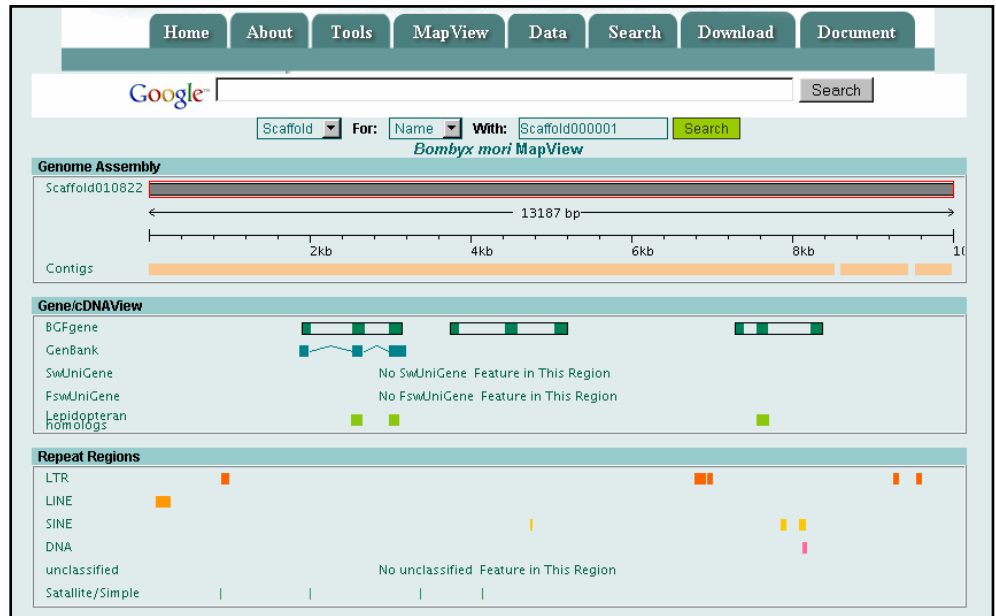
Outre son intérêt historique et commercial, le ver à soie est aussi le second modèle d'étude le plus utilisé en biologie, physiologie et génétique chez les insectes derrière l'incontournable drosophile, *Drosophila melanogaster*, et le premier modèle lépidoptère. Une grande partie des découvertes majeures dans le domaine de l'olfaction chez les insectes provient d'études ayant pour modèle le ver à soie, la première phéromone ayant été identifiée chez cette espèce [10]. Aujourd'hui, de nombreuses équipes de recherche l'utilisent pour étudier les mécanismes de l'olfaction. Le système olfactif du ver à soie est donc l'un des mieux caractérisés et ce à tous les niveaux. L'intérêt scientifique porté à ce modèle a de plus été récemment encore renforcé par le séquençage de son génome en 2004 et par la mise à disposition des séquences génomiques partielle sur Internet, une première chez un lépidoptère [11] [12]. Enfin, un outil précieux est disponible sur cette espèce, la transgénèse, permettant de manipuler génétiquement l'organisme [13].

Avant de résumer les principales connaissances accumulées sur ce modèle dans le domaine de l'olfaction, je vais présenter brièvement dans les paragraphes suivants les atouts déterminants dont nous nous sommes servis pour identifier (séquences génomiques) et tenter de mettre au point un outil de caractérisation fonctionnelle (transgénèse et système UAS/Gal4) des gènes olfactifs chez le ver à soie.

I.2. Ressources génomiques disponibles

Le génome de *B. mori* a été l'objet au début du troisième millénaire de deux projets de séquençage par deux groupes indépendants, japonais [11] et chinois [12]. Ces deux équipes ont accompli le séquençage (recouvrement 3X et 6X, respectivement) et l'ont rendu accessible aux équipes de recherche vers la fin de l'année 2004 sur deux sites Internet, (BGI, Beijing Genomics Institute, China : <http://sgp.dna.affrc.go.jp/>) (Kaiko, SGRP, Silkworm Genome Research Program, National Institute of Agrobiological Sciences, Japan : <http://silkworm.genomics.org.cn/>), ainsi que dans la base de données Genbank (NCBI) (figure 2, A et B). Pour avoir étudié tout au long de ma thèse les séquences accessibles sur ces deux sites, je dois reconnaître que si tout n'y est pas encore parfait, ils constituent des bases de travail inestimables pour un chercheur en biologie. Il faut noter que la représentation graphique des séquences génomiques annotées sur le site du groupe BGI est particulièrement pratique et conviviale, ce qui rend ce site beaucoup plus agréable à utiliser comparativement à leur concurrent du groupe SGRP. De plus, sur ce même site du BGI, un intérêt notable a été porté à l'identification de gènes. La co-existence de ces deux sites indépendants, un peu déroutante au début, s'est néanmoins vite révélée particulièrement profitable à la recherche de gènes. En effet, le cas où une séquence n'a pas été trouvée sur aucun des deux sites s'est révélé assez rare au cours de ma thèse. Lors d'un congrès de l'été 2006, le responsable de l'équipe japonaise du SGRP, K. Mita, avait annoncé une mise en commun des données génomiques provenant des deux groupes, ce qui devrait être fait début 2008.

A. BGI (China)



B. SGRP (Japan)

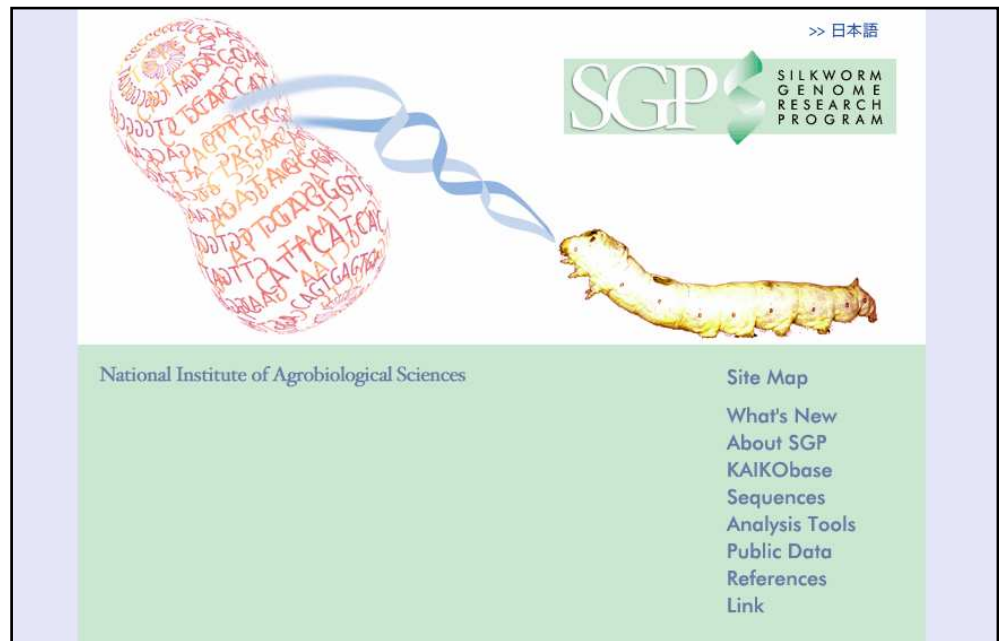


Figure 2. Présentation des deux sites Internet proposant les résultats du séquençage du génome de *B. mori*. **A.** Site du BGI (Beijing Genomics Institute) (<http://silkworm.genomics.org.cn/>), illustré par l'option Mapview qui permet de visualiser graphiquement sur chaque scaffold génomique la présence de gènes prédits par l'algorithme BGF, de gènes présents dans des bases de données (Genbank, SwUnigene, FswUnigene), de séquences homologues chez d'autres lépidoptères, et de plusieurs types de régions répétées (LTR, LINE, SINE, DNA, satellite). **B.** Site du SGRP (Silkworm Genome Research Program) (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>), illustré par la page de présentation proposant les différentes options accessibles à l'utilisateur pour ses recherches.

Le génome du ver à soie possède vingt huit chromosomes et sa taille totale est estimée entre 428,7 Mbases (BGI) et 530 Mbases (Kaiko). L'équipe du BGI a développé un algorithme de recherche de gènes appelé BGI Gene Finder (BGF) basé sur les programmes GenScan et FgeneSH et qui a permis d'évaluer le nombre total de gènes à 18510 unités. La comparaison entre le génome de la drosophile [15] et celui de *B. mori* révèle des particularités intéressantes. Au niveau de la taille, le génome du ver à soie est environ trois fois plus grand que celui de la drosophile (116,8 Mbases), de plus, il semble posséder plus de gènes (18510 contre 13379). Non seulement on trouve plus de gènes chez le ver à soie, mais ce sont aussi de plus grands gènes, résultant de l'intégration d'éléments transposables dans des introns. On retrouve également plus d'introns que chez les diptères. Cette situation particulière, avec plus de gènes, et des gènes plus longs avec plus d'introns que chez la drosophile, peut expliquer quatre vingt six pour cent du rapport trois observé entre les tailles des deux génomes. Cette situation spécifique à *B. mori* (aucune donnée sur un autre génome de lépidoptère n'est disponible publiquement) est potentiellement une source de problèmes pour la recherche de gènes car il est difficile d'identifier les limites entre les exons et les introns ainsi que les régions promotrices des gènes. Ces caractéristiques rendent en effet beaucoup plus difficile de reconstituer la séquence complète d'un gène et ces problèmes augmentent encore avec la taille du gène étudié. Pour illustrer cette situation, un exemple frappant, celui de la calcineurine B, un gène dont la séquence génomique est douze fois plus longue chez le ver à soie que chez la drosophile. Cela nous a particulièrement compliqué la tâche lors de notre étude sur les AOX qui sont des protéines de grande taille comparativement aux OBP ou aux SNMP.

I.3. La transgénèse

Si les animaux transgéniques, c'est à dire possédant un fragment d'ADN étranger intégré dans leur génome, sont des outils fantastiques pour étudier la fonction des gènes, c'est d'abord dans le but d'améliorer la production et la qualité de la soie que le développement des techniques de transgénèse chez *B. mori* trouve son origine. Réussir à transformer de façon stable la lignée germinale d'un insecte repose sur deux facteurs principaux : la méthode d'injection de l'ADN exogène dans l'embryon et le choix du vecteur biologique qui permettra l'intégration stable du transgène dans l'organisme receveur. Chez les insectes, ces vecteurs sont basés sur des éléments transposables, petits fragments d'ADN circulaire également appelés transposons, que l'on trouve naturellement chez tous les organismes et qui sont capables de transférer de façon stable une partie de leur ADN sur les chromosomes. La première espèce d'insecte sur laquelle la transgénèse fut mise au point fut la drosophile, dès 1982 [16]. Plus tard, constatant qu'aucun des transposons pourtant utilisés avec succès chez la drosophile ne fonctionnait chez un insecte non diptère, les équipes de recherche ont développé des solutions alternatives, basées sur de nouveaux éléments transposables. C'est ainsi qu'en 1999, Tamura et al présentaient leurs travaux basés sur l'utilisation du transposon piggyBac (figure 3), isolé du lépidoptère *Trichoplusia ni*, et qui permettait d'obtenir pour la première fois un système de transformation stable de la lignée germinale du ver à soie [13].

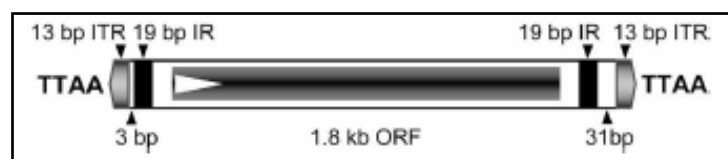


Figure 3. Représentation linéaire schématique d'un transposon de type piggyBac montrant la position des séquences terminales répétées et inversées (ITR), des séquences répétées inversées pré-terminales (IR), de la phase ouverte de lecture (ORF) et des sites d'insertion dupliqués TTAA. (D'après [17]).

Depuis cette réussite initiale (à laquelle Corinne Royer, collaboratrice de mon travail de thèse, a pris part), la technique de transgénèse n'a cessé d'être améliorée par le perfectionnement des équipements et des techniques d'injection ainsi que par l'amélioration génétique du vecteur piggyBac et des constructions transgéniques, notamment des promoteurs. Par exemple, l'utilisation du promoteur artificiel 3XP3, qui cible les tissus nerveux mais aussi les ocelles, les stemmates et les yeux, associé à la partie codante du gène de la Green Fluorescent Protein (GFP) [18], a permis de cribler les individus transgéniques de façon précoce, dès l'embryon, par visualisation de la fluorescence dans les stemmates à travers le chorion translucide. Ce premier tri est primordial pour éviter de mettre en œuvre des élevages trop importants, coûteux en temps et en énergie. Aujourd'hui, piggyBac est largement utilisé pour la transformation de plusieurs espèces d'insectes hors drosophile, et selon les protocoles utilisés et l'espèce considérée, l'efficacité de transformation par ce type de transposons varie entre deux et quarante pour cent [17].

Très récemment, la technique de transgénèse a été utilisée chez le ver à soie pour permettre l'inactivation héritable d'un gène de baculovirus par la technique de l'ARN interférence (ARNi), permettant ainsi une meilleure protection des papillons transgéniques contre l'infection virale [19]. L'ARNi est un mécanisme moléculaire de dégradation sélective d'un ARNm qui va mener à l'inhibition spécifique d'un gène choisi [20]. Ce phénomène a déjà été utilisé chez de nombreuses espèces d'insectes, le plus souvent par injections directes de petits ARN double-brins correspondants à la séquence du gène à invalider. Cet outil, associé à la transformation stable de l'organisme par transgénèse, représente un potentiel considérable pour analyser la fonction des gènes chez le ver à soie.

I.4. Le système UAS/Gal4

Ce système de transactivation de l'expression d'un transgène est un outil très utile dans la caractérisation fonctionnelle de gènes ou de promoteurs. Ce système repose sur l'expression d'un activateur transcriptionnel de levure, Gal4, placé sous le contrôle d'un promoteur choisi, et d'une séquence promotrice UAS possédant un motif d'ADN particulier reconnu par Gal4, fusionnée avec un gène d'intérêt. Ainsi, dans l'organisme, Gal4 s'exprime sous le contrôle de son promoteur, ce qui va permettre son accumulation dans un tissu particulier où sera reconnu le motif de liaison porté par les séquences UAS. Lorsque le facteur de transcription Gal4 se lie à une séquence UAS, il active de façon significative la transcription du gène d'intérêt (transactivation), permettant ainsi une expression plus importante de celui-ci dans un tissu donné. Cette technique couramment utilisée chez la drosophile a récemment été adaptée chez le ver à soie en utilisant le système de transgénèse basé sur le transposon piggyBac [21]. Dans cette étude, deux lignées transgéniques Gal4 ont été créées, l'une avec Gal4 sous le contrôle de pA3, le promoteur du gène codant pour l'actine, BmA3 [22], et l'autre sous le contrôle de 3XP3. Après croisements de ces lignées avec une même lignée où UAS est fusionné avec la partie codante du gène de la GFP, leurs descendance ont été étudiées. Le patron d'expression de la protéine fluorescente était ubiquitaire pour la descendance pA3Gal4-UASGFP et spécifique des yeux pour la descendance 3XP3Gal4-UASGFP, démontrant ainsi l'adaptabilité d'un tel outil chez le ver à soie. De plus, l'expression de la GFP dans ces lignées était significativement plus forte comparativement aux lignées pA3GFP ne bénéficiant pas de la transactivation. Ce système de transactivation par UAS/Gal4 permet non seulement d'analyser les effets d'un transgène dans un tissu donné et/ou à un moment choisi du développement, mais aussi d'exprimer des gènes létaux pour observer leurs effets ou encore d'amplifier le niveau d'expression d'un transgène dans l'organisme receveur.

Chapitre II. Le système phéromonal, composition de la phéromone et comportements associés

II.1. Généralités chez les lépidoptères

Les phéromones sont des signaux chimiques servant à la communication intraspécifique [23], et sont en général des mélanges de composés chimiques volatiles en proportions propres à chaque espèce. Elles ont été définies comme des « substances sécrétées par un organisme, souvent par une glande spécialisée et qui, reçues par un individu de la même espèce, provoquent une réaction spécifique, un comportement particulier ou une modification physiologique ». Aujourd'hui, un grand nombre de phéromones sexuelles de lépidoptères ont été identifiées (www.nysaes.cornell.edu/pheronet), en particulier sur des espèces ravageuses de culture, ce qui a permis le développement de techniques de lutte alternatives aux insecticides comme par exemple le piégeage ou encore la confusion sexuelle. Chaque espèce possède en effet son propre mélange, appelé bouquet phéromonal, qui est unique par sa composition chimique, la proportion de chaque composé ainsi que son rythme d'émission temporel. Cette spécificité du bouquet phéromonal participe, avec d'autres facteurs comme la morphologie de l'appareil reproducteur, à l'isolement reproducteur entre espèces et à son maintien. Chez les lépidoptères, le plus souvent, ces mélanges sont composés de deux ou trois molécules (parfois plus) constituées d'une chaîne hydrocarbonée (possédant 10 à 18 atomes de carbone), portant une ou deux insaturations et un groupe fonctionnel pouvant être de type alcool, aldéhyde, acétate ou encore époxyde [24].

Les phéromones émises par les femelles prêtes à s'accoupler sont capables d'attirer les mâles conspécifiques, sexuellement réceptifs, à des distances parfois supérieures à un kilomètre [25] [26] (figure 4). Les mâles localisent les femelles stationnaires en suivant les panaches de phéromone sexuelle largués dans l'environnement. Ces panaches phéromonaux filamenteux et discontinus sont composés de paquets de molécules séparés par de l'air car ils sont sujets à de nombreuses turbulences, principalement dues au vent [27] [28]. Quand un mâle vole au contact d'une telle structure, il lui est indispensable d'obtenir une résolution spatiale et temporelle de cette plume phéromonale, intermittente dans l'espace et dans le temps (figure 5). Pour cela, le mâle adopte un vol orienté en zigzag [29] [28], ce qui lui permet de définir en permanence sa position relativement à celle du message discontinu provenant de la source d'émission. Pour réussir à rester en contact permanent avec la phéromone, le temps de réaction du mâle à la perte du signal phéromonal est très rapide, de l'ordre de 0,15 s à 0,5 s [30] [31]. Cette capacité à intégrer aussi rapidement les informations olfactives démontre bien les possibilités phénoménales du système olfactif des insectes, incroyablement sensible, dynamique et spécifique, et dont je vais détailler dans les paragraphes suivants les bases structurales et moléculaires.



Figure 4. Femelle *B. mori* en position d'appel avec les glandes à phéromone dévaginées (indiquées par des flèches). (D'après [3]).



Figure 5. Représentation du vol d'un mâle lépidoptère à travers le panache phéromonal émis de façon discontinue par la femelle dans l'espace et le temps. (D'après [3]).

II.2. Le cas de *B. mori*

Chez *B. mori*, le bombykol ((E,Z)-10, 12-hexadecadiène-1-ol) (Bol) fut le premier constituant d'une phéromone sexuelle à être identifié [10]. Cette découverte provoqua un émoi considérable dans la communauté scientifique et contribua grandement à établir le ver à soie comme un modèle d'étude scientifique. La phéromone est produite par les femelles *Bombyx mori* et sécrétée par l'épithélium de deux glandes abdominales appelées saccules latéraux [32] [3]. La production de la phéromone est maximale chez les femelles de deux ou trois jours, avec un pic qui commence environ six heures après le début de la photophase et qui peut durer de deux à trois heures [33]. Pendant presque vingt ans, ce système a été considéré comme l'un des rares à impliquer un seul composé phéromonal. Puis en 1978, un deuxième composé fut identifié, analogue au Bol mais possédant une fonction aldéhyde à la place de la fonction alcool, le bombykal ((E,Z)-10, 12-hexadecadiène-1-al) (Bal) [34]. Le ratio entre les deux molécules a été estimé à dix pour un en faveur du Bol, qui constitue donc le composant majoritaire de la phéromone produite par les femelles. La structure chimique de ces deux composés est indiquée dans la figure 6.

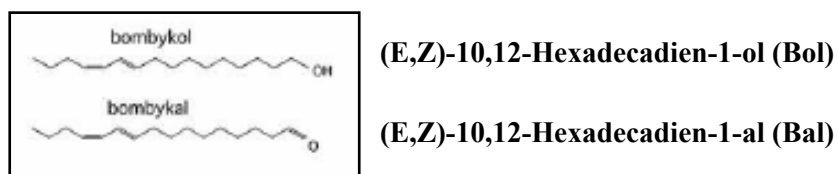


Figure 6. Structure chimique de la phéromone émise par les femelles de l'espèce *B. mori*, constituée d'un composé portant une fonction alcool (bombykol) et de son analogue portant une fonction aldéhyde (bombykal). (D'après [3]).

Le Bol provoque un comportement attractif et excitant sur les mâles de l'espèce *B. mori*, ceux-ci vibrent des ailes, courbent l'abdomen latéralement et se déplacent jusqu'à retrouver la femelle, source d'émission de la phéromone [35]. Il faut néanmoins noter, dans le cas de *B. mori*, que ce papillon a perdu avec la domestication sa capacité à voler, mais le mâle présente tout de même un comportement de recherche orienté, qui présente les mêmes caractéristiques que le vol décrit juste avant pour d'autres espèces de lépidoptères nocturnes. Dans le système phéromonal du ver à soie, le Bol seul suffit donc à provoquer le comportement d'excitation chez les mâles, alors que la fonction biologique du Bal est toujours un mystère à l'heure actuelle, comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

Chapitre III. Organisation générale du système olfactif

Le système olfactif des insectes s'organise en un système olfactif périphérique et un système olfactif central. L'antenne, qui constitue l'organe périphérique, assure la réception des molécules odorantes ainsi que la transformation du signal chimique en signal électrique par le biais des mécanismes de transduction olfactive. Le système olfactif central, situé au niveau du cerveau, assure l'intégration du message électrique provenant de l'antenne puis sa transduction jusqu'aux centres effecteurs, responsables du déclenchement (ou non) d'un comportement associé à l'odeur.

III.1. Le système olfactif périphérique : structure et organisation

La détection des molécules odorantes volatiles chez les insectes a lieu au niveau des antennes et plus précisément au niveau de structures sensorielles morphofonctionnelles, les sensilles olfactives (figure 7, A, B). Ces expansions cuticulaires présentent des morphologies variées avec une caractéristique commune, la présence de nombreux pores cuticulaires qui permettent l'entrée des molécules odorantes depuis l'environnement jusqu'à l'intérieur de la sensille où vont se dérouler les événements périrécepteurs. Ces sensilles olfactives renferment de un à trois (parfois quatre) neurones récepteurs olfactifs (NRO) qui sont les cellules capables de détecter les odeurs (figure 7, C). Ces neurones bipolaires projettent leurs dendrites dans la lumière de la sensille où ils baignent dans un milieu aqueux à la composition particulière, la lymphe sensillaire. A l'opposé, les axones des NRO vont former le nerf antennaire qui relie l'antenne aux lobes antennaires, premiers relais synaptiques au sein du système nerveux central. Outre ces NRO, trois cellules accessoires sont présentes dans les sensilles olfactives, les cellules tormogènes, thécogènes et trichogènes. Ces cellules de soutien assurent la synthèse de la cuticule sensillaire lors de son développement puis produisent la lymphe sensillaire et assurent sa composition particulière en ions et en protéines. On recense chez les lépidoptères différents types morphologiques et fonctionnels de sensilles olfactives.

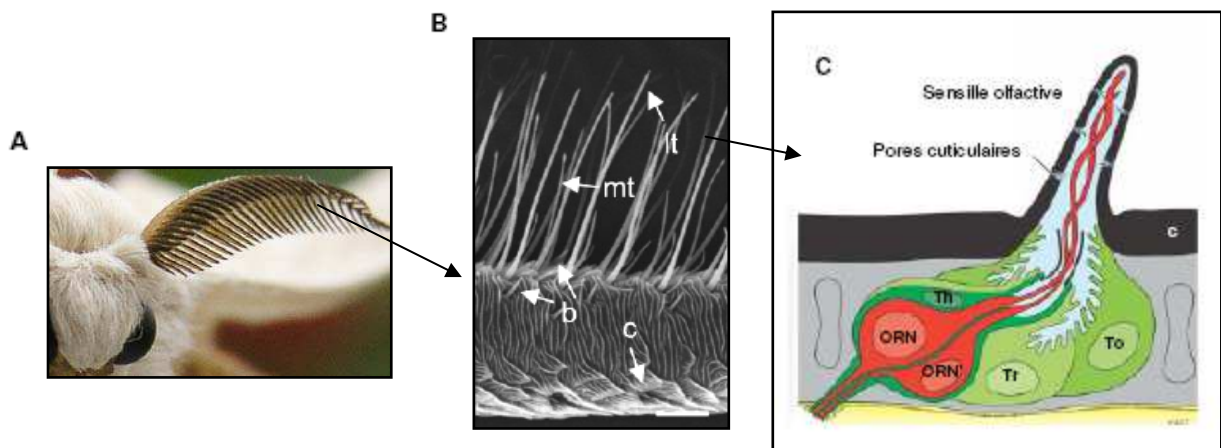


Figure 7. De l'antenne à la sensille olfactive, le cas de *B. mori*.

A. Antenne bipectinée vue de face. (D'après [3]). B. Photographie en microscopie électronique d'une branche latérale portant les sensilles olfactives : sensilles trichoïdes longues (lt), sensilles trichoïdes médium (mt), sensilles basiconiques (b), sensilles coeloconiques (c), Echelle 25µm. (D'après [36]). C. Représentation schématique d'une sensille olfactive d'insecte : neurones bipolaires (ORN), cuticule (c), lymphe sensillaire (ls), cellules trichogène (Tr), tormogène (To) et thécogène (Th). (D'après [3]).

Chez le ver à soie, les antennes sont bipectinées, formant une structure en forme de long panier délimité par deux rangées de branches latérales portant les sensilles olfactives sur leur face ventrale, la face dorsale étant recouverte d'écailles. On dénombre environ vingt cinq milles sensilles olfactives par antenne mâle et quinze milles par antenne femelle, qui peuvent être classées en quatre types principaux. Ces sensilles se présentent sur l'antenne selon un patron de distribution spatiale bien défini et sensiblement équivalent entre mâles et femelles [37] [38].

Chez *B. mori*, on recense principalement quatre types de sensilles olfactives. Les sensilles trichoïdes longues, sensibles à la phéromone chez le mâle, représentent le type sensillaire le mieux caractérisé chez le ver à soie, notamment au niveau fonctionnel.

- Ces sensilles trichoïdes longues sont largement majoritaires sur l'antenne (respectivement 17000 et 6000 environ par antenne mâle ou femelle) [39], possèdent une paroi cuticulaire épaisse qui s'effile vers la pointe. Leur nombre et leur taille sont légèrement réduits chez les femelles. Les sensilles longues sont innervées par deux NRO aux profils de réponse caractéristiques et bien définis. Chez le mâle, les deux NRO répondent chacun à un des deux composés phéromonaux identifiés, Bol et Bal [40] [34]. Chez la femelle, les deux NRO sont spécialisés envers les molécules d'acide benzoïque et de 2,6-diméthyl-5-heptène-2-ol (DMH) [41]. Les profils de réponse des NRO innervant ce type sensillaire ont été étudiés chez le mâle et la femelle par des techniques d'enregistrement électrophysiologique dont les résultats sont détaillés au paragraphe suivant.
- Les sensilles trichoïdes courtes (aussi appelées moyennes), beaucoup moins abondantes que les longues (2500 environ) [39], possèdent aussi une paroi cuticulaire épaisse qui s'effile vers la pointe. Ces sensilles seraient spécialisées dans la détection d'odeurs de plantes (Pophof, données non publiées).
- Les sensilles basiconiques, les plus nombreuses après les sensilles longues (5000 environ) [39], possèdent une paroi cuticulaire fine et constante. Ces sensilles sont également beaucoup plus courtes que les deux types de sensilles trichoïdes décrits plus haut. Elles aussi seraient spécialisées dans la détection d'odeurs de plantes, et un profil de réponse des NRO a même été dressé, incluant plusieurs constituants des feuilles de mûrier, comme des acides carboxyliques et des alcools terpéniques (Pophof, données non publiées).
- Les sensilles coeloconiques, très peu abondantes (800 environ) [39], possèdent une double paroi et une forme caractéristique de fleur. Les NRO innervant ces sensilles ont été caractérisés comme répondant à des odeurs de plantes variées, comme des alcools terpéniques, des aldéhydes et d'autres composés aromatiques présents dans les feuilles de mûrier [42].

Ce sont des travaux de microscopie électronique qui ont permis de classifier sur des bases morphologiques les principaux types de sensilles olfactives chez le ver à soie [37], mais la situation n'est pas aussi simple qu'elle le paraît. Il est en effet possible de trouver sur l'antenne des sensilles de type intermédiaire, qui combinent les caractéristiques morphologiques des sensilles décrites ci-dessus, ce qui rend difficile leur classement dans une catégorie précise [38].

III.2. Profil de réponse électrophysiologique des NRO de la sensille trichoïde longue mâle et rôle du Bal

L'électroantennographie (EAG) [43] est une approche relativement simple qui permet de caractériser la réponse globale de l'antenne lorsqu'elle est stimulée par des molécules odorantes. Un enregistrement EAG représente la somme des potentiels récepteurs des sensilles olfactives localisées entre les deux électrodes d'enregistrement. Un changement du potentiel récepteur représente un changement dans le potentiel membranaire des NRO, induit par une dépolarisation de leurs axones provoquée (ou non) par une stimulation odorante. La technique de l'enregistrement monosensillaire (Single Sensillum Recording, SSR) [44] permet de caractériser précisément le profil de réponse d'un seul NRO, par un enregistrement trans-épithélial du potentiel récepteur et des impulsions nerveuses produits (ou non) par les NRO innervant la sensille étudiée.

Chez le ver à soie mâle, des enregistrements électrophysiologiques en SSR de la sensille trichoïde longue ont révélé que chaque NRO présente un profil de réponse électrique caractéristique [34], ce qui permet de les distinguer (figure 8). En effet, l'un des deux NRO produit après stimulation une dépolarisation membranaire accompagnée d'impulsions nerveuses (potentiels d'action) dont l'amplitude est plus importante que pour l'autre NRO. Ces deux NRO répondent spécifiquement aux deux composés phéromonaux identifiés, le premier détectant le Bol et le second le Bal. La sensibilité de ces deux NRO est extrêmement développée, une seule molécule de phéromone est en effet suffisante pour produire un potentiel d'action, même si plusieurs centaines d'impulsions nerveuses sont requises pour provoquer une réponse comportementale [3]. Cette étude a donc permis d'établir le rôle fonctionnel des NRO innervant les sensilles trichoïdes longues chez le mâle dans la réception de la phéromone émise par la femelle.

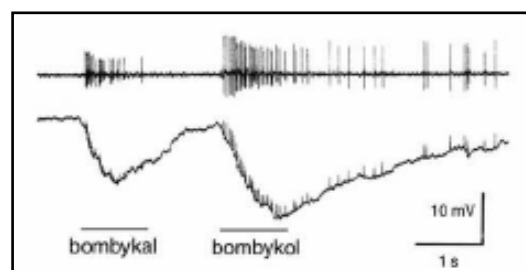


Figure 8. Profils de réponse en SSR des deux NRO de la sensille trichoïde longue mâle lors de stimulations avec les composés phéromonaux. En haut, potentiels d'action (PA) en courant alternatif. En bas, potentiels récepteurs en courant continu. Un des NRO répond au Bal (petits PA et faible amplitude de dépolarisation) (à gauche), et l'autre au Bol (grands PA et grande amplitude de dépolarisation) (à droite). (D'après [3]).

Ces travaux d'électrophysiologie couplés à des tests comportementaux ont de plus permis de caractériser le rôle inhibiteur du Bal dans la réponse du mâle au Bol [34]. En effet, quand les deux composés phéromonaux sont utilisés simultanément pour stimuler des mâles, le Bal à partir d'une certaine dose dans le mélange phéromonal supprime la réponse comportementale de ceux-ci. Il faut alors augmenter, lors de la stimulation, la dose de Bol pour lever cette inhibition et permettre à nouveau le comportement d'excitation induit par cette molécule. Quelle signification biologique peut-on accorder à cette inhibition de la

réponse à un composé majoritaire, attractif et excitant par un deuxième composé minoritaire ? Deux hypothèses ont été avancées pour essayer de l'expliquer [34]. D'abord, le ratio Bol/Bal dans la glande phéromonale femelle pourrait diminuer après copulation ce qui agirait en favorisant le premier mâle à s'accoupler et empêcherait les mâles suivants de courtiser la même femelle, mais cette hypothèse n'a jamais pu être démontrée. Ensuite, le ratio Bol/Bal pourrait être plus faible qu'estimé (par exemple seulement cinq fois plus de Bol que de Bal), rendant la réponse des mâles moins sensible au mélange, ce qui permettrait à la première femelle en appel de ne pas attirer tous les mâles à proximité, mais cela reste à démontrer. Encore aujourd'hui, le rôle biologique du Bal n'est toujours pas élucidé. Le Bal pourrait aussi constituer un intermédiaire du métabolisme du Bol, présent dans les glandes à phéromone mais non émis par les femelles.

III.3. Profil de réponse électrophysiologique des NRO de la sensille trichoïde longue femelle

Chez le ver à soie les femelles possèdent également dans leurs sensilles trichoïdes longues deux NRO très spécialisés [41]. Ces NRO détectent respectivement les molécules d'acide benzoïque et de benzaldéhyde (Priesner, données non publiées) ou de DMH (2,6-diméthyl-5-hepten-2-ol) et de linalool (3,7-diméthyl-1,6-octadiène-3-ol), un autre alcool terpénique, et ce, avec une sensibilité et une spécificité comparable à celle des NRO phéromonaux chez les mâles [45].

Le NRO spécialisé dans la perception de l'acide benzoïque (et qui détecte aussi le benzaldéhyde) pourrait servir à détecter des traces de méconium, substance intestinale produite par la chrysalide et expulsée au moment de la métamorphose imaginaire. Cette substance est en effet la seule source naturelle identifiée capable de déclencher une réponse de ce NRO, mais on ne sait pas quel composant précis provoque cette réponse [46]. La signification biologique de la détection sensible de tels composés reste très mal comprise, car aucune réponse comportementale n'a été observée chez les femelles. Une autre hypothèse serait que ces composés appartiennent à une éventuelle phéromone mâle. En effet, des phéromones mâles ont été décrites chez plusieurs espèces de lépidoptères, où elles auraient pour effet de favoriser l'acceptation du mâle par la femelle, agissant comme un aphrodisiaque [47]. De telles phéromones émises par les mâles n'ont jamais été recherchées chez *B. mori*.

L'autre NRO des sensilles longues femelles est lui spécialisé dans la perception de molécules appartenant à la famille des terpènes, qui sont très répandues dans le règne végétal. Ainsi le NRO correspondant pourrait servir à détecter des signaux chimiques émis par des plantes et qui pourraient être cruciaux pour les femelles, comme des signaux d'oviposition. Un comportement typique de battements d'ailes a été observé chez des femelles stimulées par ces alcools terpéniques [41]. Si les profils de réponse électrophysiologique de ces deux NRO ont révélé de façon surprenante qu'ils étaient aussi sensibles et spécifiques que leurs homologues des sensilles longues mâles, les caractéristiques des réponses électriques sont également similaires entre les NRO des deux sexes [41]. Le « NRO-terpène » des femelles produit en effet après stimulation un profil comparable à celui du « NRO-Bol » mâle (grandes dépolarisations et grands potentiels d'actions) alors que le « NRO-acide benzoïque » femelle produit après stimulation par son ligand un profil de réponse comparable à celui du « NRO-Bal » mâle (petites dépolarisations et petits potentiels d'actions).

Ainsi, on retrouve dans les sensilles longues des antennes des mâles et des femelles deux systèmes de détection odorante, l'un phéromonal, l'autre encore indéterminé, très

comparables et qui semblent capables de percevoir les ligands pour lesquels ils sont spécialisés avec une sensibilité remarquable.

III.4. Le système olfactif central : structure et organisation

Chez les insectes, les axones des NRO convergent et forment le nerf antennaire qui se projette vers le système nerveux central jusqu'au premier relais synaptique, le lobe antennaire (un par antenne). Cette structure est constituée de glomérules, dont le nombre est propre à chaque espèce. Les glomérules fonctionnent comme des unités synaptiques d'intégration de l'information olfactive transmise par les différents axones du nerf antennaire. Le ver à soie possède 60 +/- 2 glomérules [48] [49], contre environ 50 chez la drosophile [50] et 160 chez l'abeille [51].

On observe un dimorphisme sexuel dans la structure des lobes antennaires de lépidoptères [52]. En effet, les mâles possèdent un petit nombre de glomérules supplémentaires par rapport aux femelles, de plus grande taille et qui se regroupent pour former un complexe dit macroglomérulaire (CMG). Ce CMG, localisé à l'entrée du nerf antennaire, reçoit uniquement les informations des NRO des sensilles trichoïdes longues sensibles aux composés phéromonaux, de la même façon que tous les NRO du même type fonctionnel convergent vers le même glomérule. Chez *B. mori*, la structure du CMG a été reconstruite en trois dimensions par des techniques de microscopie confocale. Les résultats de cette étude montrent que le CMG est situé dorsalement par rapport aux glomérules du lobe antennaire, qu'il est constitué de deux glomérules de grande taille, le toroïde et le cumulus, qui interviennent respectivement dans la réponse au Bol et au Bal, et d'un plus petit appelé le sabot (ou « horseshoe ») [53] [48]. Chez la femelle, les NRO des sensilles trichoïdes longues se projettent également vers deux glomérules de grande taille [54]. Les informations olfactives reçues par les lobes antennaires sont ensuite transmises à un second relais synaptique, les corps pédonculés et la corne latérale du protocérébron. Chaque glomérule traite l'information olfactive provenant des NRO du même type fonctionnel qui y convergent. Les neurones latéraux établissent des connexions nerveuses entre différents glomérules mais ce sont les neurones de projection qui relaient ensuite les informations vers le deuxième centre synaptique, les corps pédonculés (et la corne latérale du protocérébron). Les informations olfactives qui arrivent au niveau de l'antenne sont donc reçues en deux étapes, d'abord au niveau périphérique puis au niveau central, pour générer un patron d'activation cérébrale qui va induire (ou non) le déclenchement d'un comportement en réponse aux odeurs perçues au niveau des antennes (figure 9).

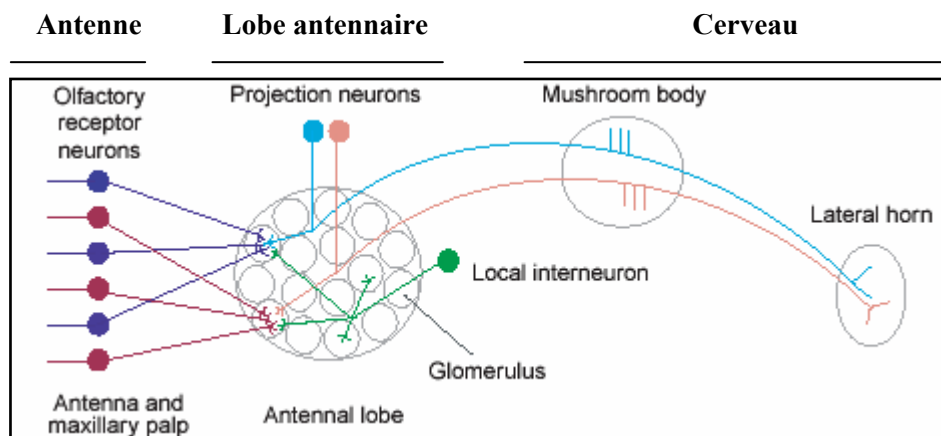


Figure 9. Organisation du système olfactif de la drosophile. (D'après [55]). L'activation des NRO par les molécules odorantes induit une dépolarisation membranaire et génère des potentiels d'action au niveau de l'axone des NRO. Les axones se projettent ensuite vers un premier relais synaptique, le lobe antennaire, constitué de glomérules au sein desquels des interneurons établissent des connexions entre glomérules. Des neurones de projection relaient ensuite l'information en projetant leurs axones vers un deuxième centre d'intégration, le corps pédonculé et la corne latérale du cerveau.

Chapitre IV. Les bases moléculaires de la réception olfactive périphérique

Différentes protéines sont impliquées dans la réception olfactive périphérique, à l'intérieur des sensilles. Ces protéines agiraient de manière séquentielle pour permettre le bon déroulement des trois étapes primordiales de la réception des odeurs. D'abord le ligand hydrophobe doit être pris en charge, solubilisé et transporté à travers la lymphe sensillaire jusqu'à un récepteur olfactif situé au niveau de la membrane dendritique du NRO. Ensuite, l'interaction avec le récepteur induit une cascade de transduction menant à la dépolarisation de la membrane neuronale. Enfin, le ligand doit être inactivé afin d'éviter de multiples stimulations ou une stimulation prolongée du site récepteur par la même molécule odorante. Ces différentes étapes vont maintenant être détaillées dans les paragraphes suivants ainsi que les rôles hypothétiques des différents acteurs moléculaires impliqués.

IV.1. Le transport des odeurs par les Odorant-Binding Proteins (OBP)

Lorsqu'elles pénètrent par un pore cuticulaire à l'intérieur d'une sensille, les molécules odorantes hydrophobes sont dans l'incapacité de traverser la lymphe sensillaire aqueuse qui les sépare des récepteurs olfactifs (RO). Ces molécules doivent donc être prises en charge, solubilisées et transportées jusqu'aux dendrites des NRO. Ce sont les protéines de liaison aux odeurs ou OBP (Odorant-Binding Proteins) qui sont censées assurer cette fonction primordiale. Depuis 1981 et la découverte du premier membre de cette famille multigénique chez le lépidoptère *Antheraea polyphemus* par un test de liaison utilisant la phéromone marquée comme sonde [56], de nombreuses études ont permis de mieux comprendre le rôle de ces protéines dans la réception olfactive. Chez les lépidoptères, les OBP identifiées peuvent être séparées en deux groupes, les OBP de type I, et les OBP de type II appelées CSP (Chemosensory Proteins) [57], sur la base de leurs homologies de séquences et de leurs patrons d'expression tissulaire.

IV.1.1. Les Chemosensory Proteins (CSP)

Les OBP de type II ou CSP sont des petites protéines solubles de faible poids moléculaire, caractérisées par une séquence primaire d'environ cent vingt acides aminés, présentant quatre résidus cystéines en positions conservées formant deux ponts disulfures. La structure tridimensionnelle d'une CSP de *Mamestra brassicae* a été étudiée par cristallographie aux rayons X [58]. La structure de MbraCSP6 est constituée de six hélices alpha entourant un étroit canal hydrophobe de liaison au ligand, de plus cette protéine est capable de lier des alkyles à longue chaîne. Récemment, un inventaire des gènes de cette famille présents dans les génomes et banques d'EST de différentes espèces a été réalisé [59]. Il ressort de cette étude que les CSP sont uniquement présentes chez les arthropodes et dans au moins dix ordres d'insectes. Cette famille présente également une grande conservation de séquence, autour de cinquante pour cent d'identité en acides aminés, mais ne partage que très peu de similarité avec les OBP de type I.

Chez le ver à soie, une diversité de CSP a été identifiée à partir du génome sur la base des homologies de séquence avec des CSP d'autres espèces (environ cinquante pour cent d'identité en acides aminés) et la conservation de la position des résidus cystéines [60]. Au total, dix-huit candidats ont été caractérisés, contre quatre chez la drosophile et sept chez l'anophèle [61], et leur patron d'expression étudié par RT-PCR et au moyen de puces à ADN. Les résultats de cette étude démontrent que les membres de cette famille sont exprimés en fin

de stade larvaire et chez l'adulte. Au niveau tissulaire, la majorité de ces candidats CSP sont exprimés de façon très large, dans beaucoup de tissus, dont les antennes et les glandes phéromonales. Au contraire des OBP de type I, les gènes codant pour des CSP présentent donc un profil d'expression beaucoup plus large, étendu à de nombreux tissus en dehors des antennes, notamment aux pattes et aux ailes. Ces protéines pourraient donc jouer un rôle général de liaison et de transport non spécifique de molécules hydrophobes dans différents tissus, comme cela a été démontré par des tests de liaison chez un CSP de *M. brassicae* [62], même si une fonction chimiosensorielle n'est pas à exclure pour les CSP exprimées spécifiquement dans les antennes.

IV.1.2. Les protéines de liaison aux odeurs : PBP, GOBP et ABPX

Les OBP de type I, spécifiquement exprimées dans les antennes, peuvent être sous divisées en trois familles distinctes : les PBP [56], extrêmement abondantes dans la lymphe sensillaire (10 μ M) [63], exprimée de façon majoritaire chez les mâles et censées lier spécifiquement des composés phéromonaux, les GOBP [64] [65], exprimées de façon équivalente dans les antennes des deux sexes et censées lier des odeurs plus générales, comme des odeurs de plantes, et les Antennal Binding Protein X (ABPX) [66], qui présentent très peu d'homologies avec les deux autres sous-familles et dont le rôle est aujourd'hui toujours inconnu. Il est important de noter que cette classification est uniquement basée sur des homologies de séquences et non sur des propriétés fonctionnelles démontrées.

Ces OBP sont de petites protéines hydrophiles de faible poids moléculaire (autour de 15 à 16 kDa) et de forme globulaire, qui possèdent un peptide signal de sécrétion et un point isoélectrique (pI) acide. Les OBP de type I sont caractérisées par une séquence primaire d'environ cent quarante acides aminés présentant six résidus cystéines en positions conservées formant trois ponts disulfures. La structure tridimensionnelle des OBP a été analysé chez diverses espèces d'insectes et présente une grande conservation [67]. Cette structure est constituée de six hélices alpha, dans une configuration très différente de celle des CSP, entourant une poche interne de liaison hydrophobe. Un grand nombre d'OBP ont maintenant été identifiées par homologie chez plus de quarante espèces d'insectes appartenant à huit ordres, principalement des lépidoptères et des diptères [5] [7] (figure 10).

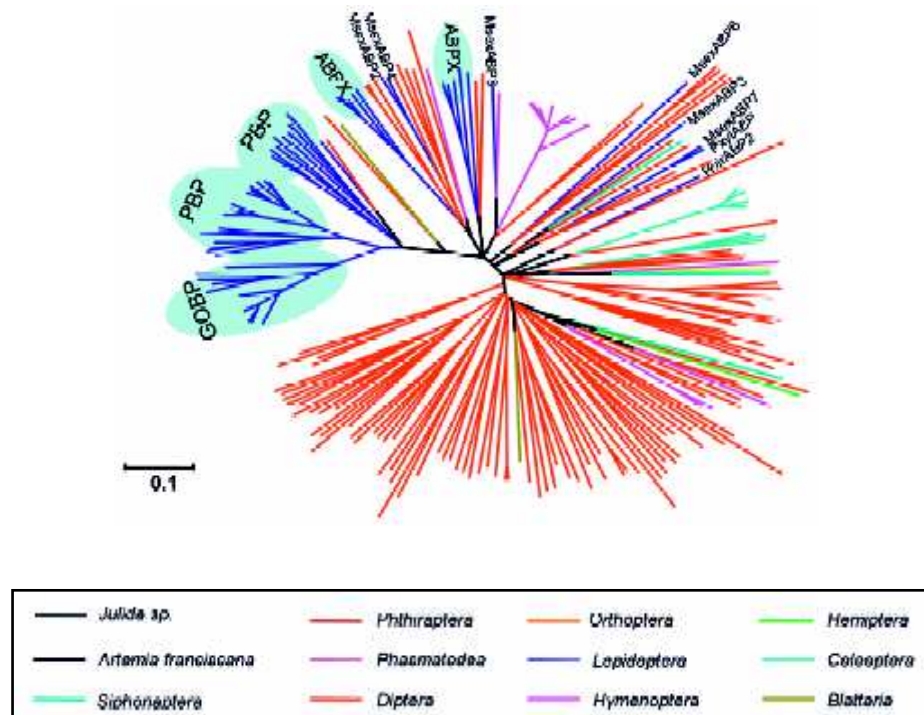


Figure 10. Cladogramme de toutes les OBP d'insectes appartenant à différents ordres et dont les séquences ont été annotées. Les OBP de lépidoptères, en bleu, se regroupent dans trois clusters, les PBP, les GOBP et les ABPX. (D'après [7]).

Si les rôles de solubilisation et de transport des molécules odorantes par ces protéines sont maintenant bien acceptés, les OBP pourraient également assurer d'autres fonctions dans la réception olfactive périphérique. Elles pourraient, par exemple, contribuer à la spécificité de la réponse olfactive, en se liant de façon différentielle à différents odorants, mais aussi participer à l'activation des RO, en complexe avec le ligand odorant, ou enfin, être impliquées dans l'étape de terminaison du signal (rôle de « scavenger »), en bloquant les ligands, les empêchant ainsi de stimuler les RO. Je vais résumer maintenant les résultats les plus intéressants réalisés sur cette famille de protéines, en me basant principalement sur le modèle *B. mori* et l'étude de sa PBP, BmPBP1, mais aussi sur des études réalisées sur des OBP chez d'autres espèces de lépidoptères.

IV.1.2.1. Expression différentielle des OBP chez le ver à soie

Chez le ver à soie, quelques OBP ont été identifiées à partir d'une banque d'ADNc d'antennes : une PBP (BmPBP1), deux GOBP (BmGOBP1 et 2), et une ABPX (BmABPX) [66]. La distribution précise de ces protéines dans les antennes de *B. mori* a ensuite été étudiée principalement par des techniques d'immunocytochimie et de microscopie électronique [68] [69] [38].

Ces différents travaux ont permis de montrer que BmPBP1 était exprimée de façon prédominante dans les antennes mâles (mais aussi faiblement chez les femelles dans un type sensillaire indéterminé) et était localisée de façon exclusive dans les sensilles longues qui répondent à la phéromone, alors que les sensilles longues femelles, qui répondent à l'acide

benzoïque et aux terpènes, expriment uniquement BmGOBP2, ainsi que BmGOBP1. Seules les sensilles trichoïdes longues mâles et femelles présentaient un patron d'expression unique, les autres types sensillaires, qui sont censés répondre à des odeurs de plantes [42] (Pophof, données non publiées), exhibant une grande diversité d'expression, certains patrons se retrouvant plus fréquemment que d'autres. Cette expression différentielle des OBP dans les sensilles (trichoïdes moyennes, basiconiques et intermédiaires, les sensilles coeloconiques n'ont pas été incluses dans ces études) suggère l'existence de différents types fonctionnels dans ces types morphologiques de sensilles, spécialisés dans la détection d'odeurs particulières, probablement d'origine végétales [38].

Ces études ont permis de montrer, comme chez d'autres espèces de lépidoptères, que les sous-familles d'OBP du ver à soie sont exprimées de façon différentielle dans les différents types fonctionnels de sensilles olfactives. Chez les lépidoptères en général, cette localisation des PBP dans les sensilles trichoïdes longues uniquement, alors que les GOBP sont localisées dans des types sensillaires variés, suggère une implication potentielle de ces protéines dans la reconnaissance spécifique des molécules odorantes, les phéromones pour les PBP et des odeurs de plantes générales pour les GOBP [64].

IV.1.2.2. Structure et fonction de BmPBP1

BmPBP1, la seule PBP identifiée jusqu'ici chez *B. mori*, est une des PBP les plus étudiées, ce qui a permis de proposer des hypothèses sur les rôles de cette classe protéique et d'établir un modèle complet de l'interaction entre BmPBP1 et son ligand, le Bol. Cette protéine se lierait de façon spécifique au Bol, le composant majoritaire de la phéromone sexuelle émise par la femelle [70]. De nombreuses études ont été réalisées pour décrire ce modèle, incluant la production de protéines recombinantes utilisées dans des systèmes *in vitro* [71] ou *in vivo* [72] [73] de stimulation électrophysiologique, l'étude de la structure tridimensionnelle par cristallographie aux rayons X [74] ou résonance magnétique nucléaire [75].

La structure tridimensionnelle de BmPBP1 libre ou en complexe avec le Bol a été analysée par cristallographie aux rayons X [74] et RMN [75] [76]. Pour résumer ces différents travaux, la protéine possède six hélices alpha, stabilisées par trois ponts disulfures, et le Bol est complètement enfermé à l'intérieur d'une poche interne de liaison hydrophobe formée par quatre hélices anti-parallèles, dans laquelle la molécule de phéromone semble fortement liée par l'intermédiaire de nombreuses liaisons hydrophobes (figure 11).

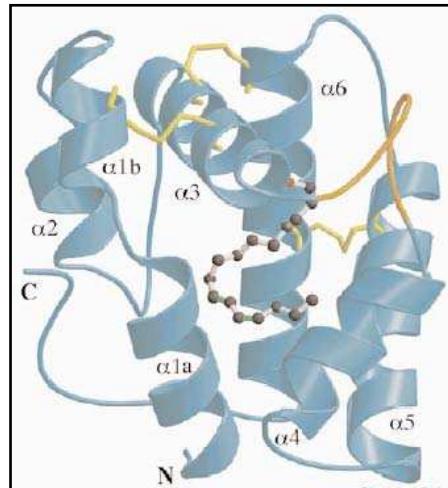


Figure 11. Structure tridimensionnelle par diffraction aux rayons X de BmPBP1 avec la position des hélices alpha et des domaines N et C terminaux. La molécule de bombykol est représentée en noir et la boucle couvrant la poche hydrophobe de liaison est en orange. (D'après [74]).

Une flexibilité structurale de BmPBP1 sous la dépendance du pH a également été observée, fournissant des arguments très intéressants quant aux mécanismes d'entrée et de largage du ligand par cette protéine [70] [74]. Il existe en effet deux conformations de BmPBP1, une forme basique (au dessus de pH 6), BmPBP1b, et une forme acide, BmPBP1a (en dessous de pH 5). Ainsi, dans la lymphe sensillaire, qui présente un pH neutre, le Bol est situé à l'intérieur de la poche de liaison hydrophobe de BmPBP1b, permettant ainsi sa solubilisation et son transport. Par contre, à proximité de la surface membranaire des NRO, une région censée posséder un pH acide, la protéine BmPBP1a ne peut alors plus lier le Bol. Dans cette conformation BmPBP1a, l'extrémité C-terminale de la protéine forme une nouvelle hélice alpha, qui va occuper et remplir la cavité interne de liaison au ligand, expulsant du même coup celui-ci à l'extérieur de la structure. Le ligand serait ainsi directement présenté aux RO. Il est probable que ce changement de conformation survienne également au niveau de la cuticule sensillaire (qui est censée posséder également un pH acide), permettant ainsi d'expliquer l'entrée du ligand dans la cavité de la protéine aux abords des pores tubules. Le mécanisme proposé pour un tel gradient de pH à l'intérieur d'une sensille repose sur les caractéristiques des membranes, où les phospholipides chargés négativement créeraient un environnement acide très localisé (figure 12).

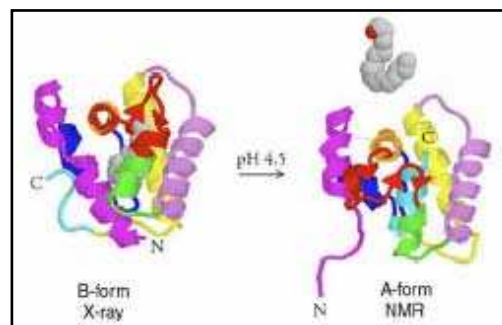


Figure 12. Illustration par les structures tridimensionnelles en RMN et en Rayons X du mécanisme de changement de conformation de BmPBP1 sous l'influence du pH. A pH acide, (à droite) l'extrémité C-terminale de la protéine (en bleu clair) forme une nouvelle hélice qui occupe la cavité hydrophobe de liaison, contribuant au largage du ligand. (D'après [3]).

Des études de cinétique transitoires *in vitro* par des techniques de fluorescence ont également permis d'estimer le temps nécessaire *in vivo* à la prise en charge des molécules de Bol par des protéines BmPBP1 recombinantes, ainsi qu'à leur largage induit par le changement de conformation pH-dépendant décrit plus haut [77]. Ces deux réactions se dérouleraient respectivement avec des demi-vies de l'ordre d'une et de quelques millisecondes, appuyant l'hypothèse que les PBP seraient primordiales dans la dynamique très rapide de la réponse des NRO à la phéromone. De plus, ce travail a démontré par un nouveau test de liaison sous différentes conditions de pH que la forme BmPBP1b possédait une bien plus grande affinité pour le Bol que la forme BmPBP1a, confirmant ainsi les prédictions structurales.

IV.1.2.3. Sélectivité de BmPBP1 vis à vis du Bol et du Bal

Comme on l'a vu, les PBP pourraient intervenir dans la spécificité de reconnaissance par une liaison spécifique avec les composés phéromonaux, assurant ainsi un premier tri de l'information. Le rôle sélectif de BmPBP1 vis à vis des deux composés phéromonaux Bol et Bal a été l'objet d'études récentes, aux résultats controversés.

Certains travaux suggèrent une interaction spécifique de la protéine avec le Bol uniquement. Dans une première étude *in vivo*, la combinaison Bal-BmPBP1 appliquée par « tip-opened sensilla » durant un enregistrement électrophysiologique ne provoquait aucune réponse des NRO au Bal, alors que la combinaison Bol-BmPBP1 provoquait une forte réponse du NRO au Bol [72], suggérant le rôle sélectif de BmPBP1 dans la solubilisation du Bol. Dans une deuxième étude *in vitro*, des lignées cellulaires exprimant BmOR1 ou BmOR3, les RO impliqués respectivement dans la réponse au Bol et au Bal (voir paragraphe IV.2)), ont été stimulées par les deux composés Bol ou Bal en présence de protéine BmPBP1 recombinante ou de DMSO [71]. Le fait que les lignées exprimant BmOR1 répondaient au Bol mais aussi au Bal quand ces composés étaient solubilisés par du DMSO, mais ne produisaient aucune réponse au Bal en présence de BmPBP1, alors que les cellules répondaient de façon robuste au Bol, appuie là encore un rôle sélectif de cette protéine dans le transport du Bol.

L'existence de plusieurs types de PBP chez des espèces utilisant plusieurs composés phéromonaux distincts, une situation fréquemment observée chez les lépidoptères, avait conduit à l'hypothèse généralement admise que chaque PBP serait capable d'interagir spécifiquement avec un des produits composant la phéromone. Par exemple, trois PBP sont recensées chez les espèces *Antheraea polyphemus*, *Antheraea pernyi* [78], ainsi que chez *Manduca sexta* [79] [80], alors que deux PBP ont été identifiées chez les espèces *Mamestra brassicae* [81], *Heliothis virescens* [82], et *Sesamia nonagrioides* [83].

De plus, plusieurs études chez différentes espèces de lépidoptères ont aussi montré une spécificité de liaison entre PBP et composés phéromonaux, en particulier chez *A. polyphemus*, *A. pernyi* et *L. dispar* [84] [85] [86]. Chez *A. polyphemus* et *A. pernyi*, les propriétés de liaison des PBP ont été étudiées au niveau biochimique, en utilisant des composés phéromonaux marqués au tritium [84]. Dans ce travail, chez les deux espèces, chacune des trois PBP placée en situation de compétition se lie de façon préférentielle à l'un des trois composés phéromonaux. Ainsi, chez ces espèces, les sensilles trichoïdes longues sont innervées par trois

NRO qui répondent chacun à un composé de la phéromone, et disposent de trois PBP qui semblent spécialisées dans le transport d'un composé particulier [78] [84], supportant l'idée que les PBP contribueraient à la reconnaissance spécifique des ligands phéromonaux.

Néanmoins, des données contradictoires ont émergé de travaux chez *B. mori* basés sur des calculs d'énergie libre et des simulations virtuelles de liaison entre BmPBP1 et les deux composés phéromonaux [87]. Selon cette étude, BmPBP1 serait en effet capable de lier le Bol et le Bal, ce qui a été confirmé par des tests de liaison en utilisant une protéine recombinante purifiée.

La fonction précise de ces protéines, de même que leur sélectivité réelle, n'est donc pour le moment pas complètement élucidée et donne lieu à de nombreuses controverses. Si les rôles de solubilisation et de transport des ligands odorants à travers la lymphé sensillaire sont unanimement acceptés, on ne sait pas si les OBP sont également impliquées dans l'activation des récepteurs, en complexe avec leur ligand, ou encore si elles jouent un rôle dans l'inactivation rapide du signal (rôle de scavenger).

IV.1.2.4. Rôle des OBP dans l'activation des RO

Un travail préliminaire chez *B. mori* et *A. polyphemus* a étudié la réponse des NRO de la sensille longue mâle par « tip-opened sensilla » en appliquant différentes combinaisons de phéromones et de PBP durant un enregistrement électrophysiologique [72]. La réponse des NRO semblait dépendre à la fois du composé phéromonal mais aussi du type de PBP utilisé pour le solubiliser. En effet, quand un NRO spécifique d'un composé A était stimulé par une combinaison PBP spécifique de A / composé phéromonal B, une réponse était observée non seulement pour le NRO spécifique du composé B mais aussi pour le NRO spécifique du composé A. Comme le ligand A était absent lors de la réponse du NRO spécifique, l'auteur a émis l'hypothèse selon laquelle cette PBP pourrait être directement impliquée dans l'activation du NRO correspondant.

Néanmoins, plusieurs études ultérieures ont démontré que les récepteurs phéromonaux (RP) de *B. mori* pouvaient répondre à la phéromone en l'absence de BmPBP1, lorsque les composés phéromonaux étaient dissous à l'aide d'un solvant organique (DMSO) [71] [73]. De plus, comme nous le verrons au paragraphe IV.3), de nouvelles hypothèses basées sur une autre famille de protéines, les SNMP, pourraient permettre de mieux comprendre comment les ligands odorants sont reçus par les RO. Enfin, les mécanismes de largage du ligand par des changements de conformation dépendants du pH observés avec BmPBP1 ne semblent guère compatibles avec une implication directe d'un complexe OBP-ligand dans l'activation des RO.

IV.1.2.5. Rôle potentiel de scavenger des OBP

La découverte, chez *A. polyphemus*, qu'une PBP pouvait adopter deux formes se comportant différemment vis-à-vis de la phéromone a conduit à l'hypothèse d'une implication des OBP dans l'inactivation du signal (rôle de « scavenger ») [88]. Cette PBP d'*A. polyphemus* pourrait en effet adopter une forme réduite pouvant transporter la phéromone et qui permettrait l'activation des RO, mais cette protéine pourrait aussi adopter une forme oxydée qui bloquerait la phéromone à l'intérieur de la poche de liaison interne, empêchant du coup l'activation des RO. C'est cette forme oxydée qui jouerait le rôle de scavenger. Ce

phénomène serait basé sur l'intervention d'un hypothétique facteur présent dans la lymphe sensillaire et qui serait responsable, en présence de la phéromone, de la transition entre les deux formes réduites (actives) et oxydées (verrouillées) de la protéine. Ces observations sont théoriquement compatibles avec un rôle dans l'inactivation rapide du signal par les OBP, mais il convient de prendre ces résultats avec précaution car beaucoup d'incertitudes subsistent sur ces travaux.

On a vu également que BmPBP1 est capable d'adopter deux formes différentes en fonction du pH et que ce sont les charges négatives présentes sur les membranes qui seraient responsables de ce changement de conformation. On pourrait imaginer, à partir de cette observation, que l'intervention d'un facteur inconnu présent dans la lymphe sensillaire puisse agir sur les changements de conformation de la PBP, empêchant par exemple le passage à la forme acide et par conséquent le largage du ligand à l'extérieur de la protéine. La PBP bloquerait ainsi le ligand à l'intérieur de sa poche de liaison hydrophobe permettant ainsi de l'inactiver. Un tel phénomène reste bien sûr très hypothétique, surtout en l'absence de preuves moléculaires de l'existence d'un tel facteur.

Cette hypothèse du rôle de « scavenger » par les OBP a été utilisée pour construire un modèle cinétique des événements périrécepteurs et récepteurs chez *A. polyphemus* [89].

IV.2. La détection des odeurs par leur interaction avec les récepteurs olfactifs (RO)

Le profil de réponse spécifique d'un NRO soumis à des stimulations odorantes est défini par l'expression de protéines réceptrices ancrées à l'intérieur de la membrane dendritique des neurones [8] [9] [90] [91]. L'interaction spécifique de ces récepteurs olfactifs (RO) avec leur(s) ligand(s) induit une cascade de signalisation qui serait médiée par des protéines G, entraînant la production de seconds messagers (inositol triphosphate (IP3) chez les insectes, mais peut être aussi le diacylglycérol (DAG)) [2], qui vont activer l'ouverture de canaux ioniques, conduisant à la dépolarisation de la membrane du neurone (produisant le potentiel récepteur) ainsi que l'ouverture de canaux voltage dépendants conduisant à la production d'impulsions nerveuses ou potentiels d'action.

IV.2.1. La découverte des RO de vertébrés puis d'insectes

La découverte en 1991 des premières séquences de RO chez le rat, *Rattus norvegicus*, constitua une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires de la perception des odeurs [92]. Cela valut d'ailleurs à ses auteurs, Linda Buck et Richard Axel, de recevoir le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2004. Ils démontraient dans cette étude fondamentale que les RO font partie de la famille des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG), qui sont caractérisés par la présence de sept domaines transmembranaires, avec un domaine N-terminal situé du côté extracellulaire (figure 13). L'identification par homologie de nouvelles séquences de RO chez d'autres espèces de vertébrés fut couronnée de succès, mais de telles approches ne permirent pas d'identifier la moindre séquence de RO chez un non-vertébré, ce qui suggérait une grande divergence entre les RO de ces deux taxons.

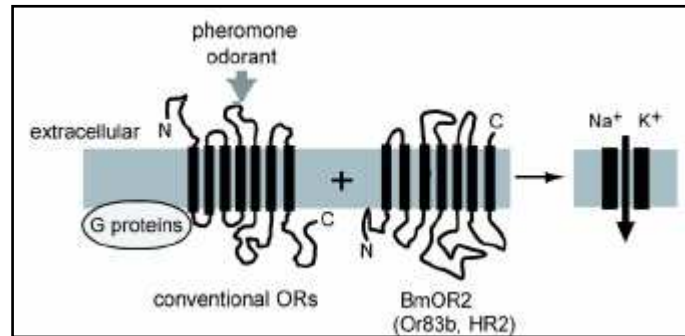


Figure 13. Représentation d'un récepteur olfactif (RO) conventionnel à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G (RCPG) ancré dans la membrane dendritique d'un NRO. Ce récepteur est associé au récepteur atypique R2 qui permet la signalisation à la membrane et l'expression fonctionnelle des récepteurs olfactifs. L'activation du RO déclenche l'ouverture de canaux ioniques (Na⁺, K⁺) (D'après [93]).

Ce n'est qu'en 1999 avec le séquençage complet du génome de la drosophile que les premières séquences de RO d'insectes ont été identifiées [94] [95]. En se basant sur l'hypothèse que les RO d'insectes devaient également appartenir à la famille des RCPG, les auteurs ont donc recherché dans le génome tous les gènes codant pour de telles protéines par l'utilisation de logiciels bioinformatiques de recherche de domaines transmembranaires. Associé au critère de spécificité d'expression dans les organes chimiosensoriels, les chercheurs ont ainsi pu sélectionner une soixantaine de candidats chez la drosophile [96].

Depuis, avec le développement du séquençage de génomes complexes, des séquences de RO ont été identifiées par des démarches bioinformatiques chez d'autres espèces pour lesquelles le génome a été partiellement ou entièrement séquencé, comme les diptères *Anopheles gambiae* [97] [98], *Culex quinquefasciatus* [99], les lépidoptères *Heliothis virescens* [100] et *B. mori* [101] [93] [102], et l'hyménoptère *Apis mellifera* [103].

L'accumulation de séquences de RO confirme aujourd'hui la grande divergence de cette famille (vingt pour cent d'identité de séquence en moyenne), non seulement entre espèces proches, mais aussi au sein d'une même espèce, ce qui explique les échecs précédents d'identification par homologie.

La seule exception à cette règle concerne un membre particulier de cette famille, appelé OR83b chez la drosophile [104] et BmOR2 chez le ver à soie [105]. Ces RO, appelés le plus souvent R2 chez les lépidoptères, présentent en effet une grande conservation de séquence entre différentes espèces d'insectes et un patron d'expression bien particulier. Alors qu'en règle général un NRO exprime un seul type de RO, R2 apparaît exprimé dans tous les NRO. Ces RO particuliers ne semblent pas intervenir directement dans la réception des odeurs, mais leur co-expression avec les RO conventionnels dans les sensilles olfactives est indispensable à la détection des odeurs [93]. Chez la drosophile, son rôle a été démontré dans l'adressage des RO jusqu'à la membrane dendritique et dans la formation d'hétérodimères fonctionnels avec ceux-ci [106] [104].

La découverte du répertoire complet des RO chez la drosophile (62 au total) grâce à l'analyse de son génome a été suivie de l'établissement du patron d'expression de ces RO dans les sensilles puis de celui d'un schéma de codage de l'information olfactive à partir des projections axonales vers le cerveau (figure 14). Un NRO exprime en général un seul type de RO [96] [94] [107], ou deux [108], et les axones des NRO exprimant le même RO convergent

vers le même glomérule du lobe antennaire [109] [110]. Puis, le développement d'analyses fonctionnelles *in vitro* ou *in vivo*, couplées à différentes méthodes d'analyse électrophysiologique ou d'immunocytochimie, a permis de définir des types fonctionnels de RO et d'établir le schéma suivant. Une molécule odorante est reconnue par plusieurs RO et un RO reconnaît généralement plusieurs odeurs [111]. Le schéma de codage olfactif depuis les NRO périphériques jusqu'aux centres intégrateurs est remarquablement similaire à la situation observée chez les vertébrés [112].

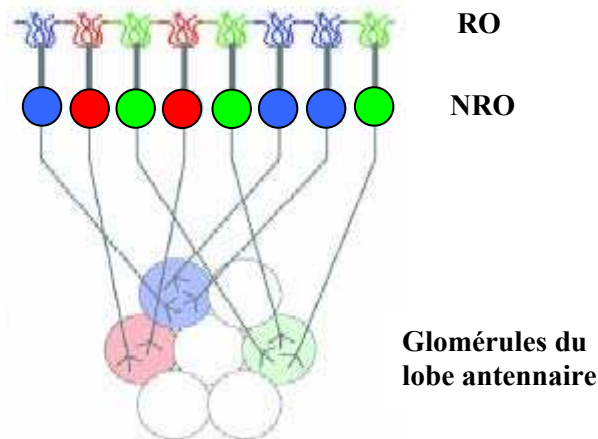


Figure 14. Illustration du codage des informations olfactives du niveau périphérique à central chez la drosophile. Un NRO exprime un seul récepteur olfactif (RO) et tous les NRO exprimant les mêmes RO convergent vers le même glomérule. (D'après [113]).

Dans une étude récente, un répertoire de quarante-huit RO a été identifié chez le ver à soie [102]. Parmi ceux-ci, on retrouve de nombreux orthologues de RO identifiés chez *H. virescens*, ce qui indique un lien de parenté évolutif entre ces lignées de RO. Des expériences de PCR en temps réel ont permis de montrer que si une majorité des RO du ver à soie s'expriment de façon relativement équivalente dans les antennes des deux sexes, certains sont clairement sur-exprimés de manière spécifique dans les antennes mâles ou femelles. Ainsi, *BmOR19* et *BmOR30* qui sont exprimés respectivement 830 et 90 fois plus chez les femelles que chez les mâles, pourraient, malgré leur faible expression chez les mâles, être impliqués dans la détection de signaux chimiques induisant des comportements femelle-spécifiques. Au final, cette étude recense une douzaine de RO chez le ver à soie qui pourraient être impliqués dans l'induction de comportements sexe-spécifiques, sept chez les femelles (*BmOR9*, 12, 19, 30, 45, 46, 47) et cinq déjà connus chez les mâles (*BmOR1*, 3, 4, 5, 6), correspondant potentiellement à des RP, comme on va le voir au paragraphe suivant.

IV.2.2. Les récepteurs phéromonaux (RP) d'insectes

Parmi les RO identifiés à ce jour, très peu de séquences de récepteurs phéromonaux (RP) potentiels sont connus. Un RP est censé interagir spécifiquement avec un des composés phéromonaux de l'espèce considérée. Chez la drosophile, un récepteur appartenant à la famille des récepteurs gustatifs (RG), GR68 a été démontré comme essentiel au comportement de cour provoqué par une phéromone sexuelle non volatile perçue par contact [114]. Les RG, comme les RO, sont des protéines appartenant à la famille des RCPG. Soixante neuf candidats ont été identifiés chez la drosophile [115]. Ces RG de drosophile

présentent entre eux une grande divergence de séquence (autour de vingt pour cent d'identité). Toujours chez la drosophile, un autre récepteur appartenant à la famille des RO, OR67d, est lui impliqué dans la réponse d'un NRO au cis-vaccenyl acétate (cVA), un composé phéromonal volatile émis par les mâles [116].

Chez les lépidoptères, des RP ont été identifiés chez seulement deux espèces, *H. virescens* [117] et *B. mori* [101] [93] [36]. En partant de l'hypothèse que les RP seraient exprimés uniquement ou préférentiellement dans les antennes mâles, des études ont mis en évidence plusieurs séquences de RP potentiels par une stratégie de criblage différentiel d'une banque d'ADNc d'antennes mâles. Ces études ont permis d'identifier quatre candidats chez *H. virescens* (Hvir13, 14, 15, 16) et cinq chez *B. mori* (BmOR1, 3, 4, 5, 6), dont les trois premiers ont été démontré comme exclusivement exprimés chez les mâles alors que les deux autres étaient aussi faiblement présents dans les antennes femelles.

Chez le ver à soie, deux de ces RP mâle-spécifiques, *BmOR1* et *BmOR3*, semblaient particulièrement intéressants car exprimés dans deux NRO adjacents situés à la base des sensilles trichoïdes longues sensibles à la phéromone [93]. La caractérisation fonctionnelle *in vitro* de ces deux RP a d'abord été réalisée en utilisant un système d'expression hétérologue, en oocytes de *Xenopus laevis*, et a permis de démontrer la spécificité de la réponse de BmOR1 et BmOR3 au Bol et au Bal respectivement [101] [93]. De plus, dans la même étude, l'expression de BmOR2 dans les oocytes exprimant BmOR1 ou BmOR3 a grandement accru la réponse électrophysiologique spécifique à ces deux composés phéromonaux, indiquant le rôle primordial de cette famille de récepteurs atypiques dans la réception phéromonale. Dans une seconde étude fonctionnelle, les deux RP de *B. mori* ont été exprimés de façon hétérologue dans des lignées cellulaires HEK. Dans ce système, lorsque les phéromones étaient solubilisées par du DMSO, les cellules qui exprimaient BmOR3 ont répondu uniquement au Bal alors que les cellules qui exprimaient BmOR1 ont été activées par le Bol mais aussi par le Bal, mettant ainsi en doute la spécificité réelle de ce RP [71]. Récemment, BmOR1 a également été exprimé *in vivo* dans le système « d'empty neurone » de la sensille ab3 de drosophile [73]. Ce système d'analyse fonctionnelle est basé sur une souche mutante de drosophile (delta halo) où la délétion des deux RO de la sensille ab3 a rendu le NRO correspondant (ab3A) vide. Ce neurone ab3A peut alors être utilisé pour exprimer de façon hétérologue, par le système UAS/Gal4, des RO dans cette sensille ab3 dont la réponse électrophysiologique à différents odorants peut être mesurée par la technique du SSR. Dans ce système, BmOR1 s'est révélé capable de répondre non seulement au Bol mais aussi, de façon plus faible, au Bal, confirmant les résultats de la seconde étude. Pour le moment, les ligands reconnus spécifiquement par BmOR4, 5, 6 ne sont toujours pas connus.

Les RP identifiés jusqu'à présent présentent une certaine identité de séquence entre eux (autour de quarante pour cent) et constituent donc une sous-famille distincte parmi les séquences de RO qui sont très divergentes entre elles, à l'exception notable de la sous-famille R2/OR83b (figure 15). L'identification de nouveaux couples RP/composé phéromonal chez des lépidoptères constitue une étape cruciale et nécessaire afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la réception phéromonale qui sont eux mêmes directement à l'origine des comportements reproducteurs chez les insectes. Les RO et plus particulièrement les RP pourraient donc constituer des cibles potentielles de choix pour développer de nouvelles méthodes de lutte intégrée contre les insectes nuisibles en perturbant leur communication phéromonale et donc leur reproduction. L'identification et la caractérisation fonctionnelle des membres de cette famille représentent donc un enjeu actuel majeur dans le domaine de l'olfaction chez les insectes. Le développement d'outils d'analyse fonctionnelle *in*

in vitro (par exemple en culture cellulaire) ou *in vivo* (à l'intérieur d'un organisme) devrait permettre de mieux comprendre le fonctionnement des RO et leur implication précise dans le comportement des insectes.

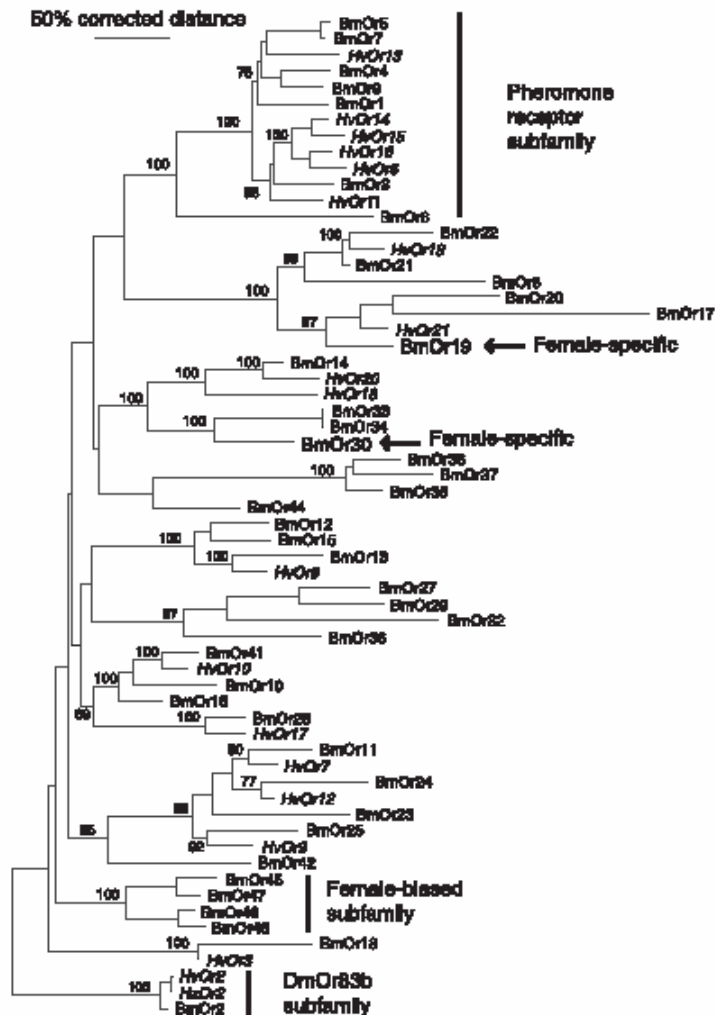


Figure 15. Arbre phylogénétique des RO de lépidoptères dont les séquences ont été annotées chez deux espèces: *B. mori* (BmOr) et *H. virescens* (HvirOr). Les récepteurs divergents R2/Or83b de ces deux espèces et de drosophile ont été utilisés pour raciner l'arbre. La sous-famille des RP est regroupée dans un cluster, alors que les RO femelle-spécifiques chez *B. mori* (indiqués par une flèche) sont dispersés dans l'arbre. (D'après [102]).

IV.3. Un rôle central des Sensory Neuron Membrane Proteins (SNMP) dans l'olfaction, mais lequel ?

IV.3.1. Les SNMP, une deuxième famille de récepteurs des NRO

Une seconde famille de gènes codant pour des récepteurs a été identifiée dans les NRO des antennes de plusieurs espèces de lépidoptères. Les SNMP (Sensory Neuron Membrane Proteins) constituent une famille multigénique codant pour des récepteurs à deux domaines transmembranaires entourant une large boucle extracellulaire elle-même contenant plusieurs cystéines à des positions conservées [118]. Ces récepteurs particuliers présentent donc une topologie très différente de celle des RO appartenant à la famille des RCPG. Un rôle potentiel de récepteur olfactif *sensu stricto* paraît donc à écarter pour les membres de cette famille, malgré leur localisation exclusive dans les NRO.

La première SNMP a été identifiée chez *A. polyphemus* par une analyse du profil protéique des NRO contenus dans les sensilles olfactives [118]. *Apo1SNMP1* code pour une protéine abondante de 67kDa, localisée exclusivement au niveau des segments dendritiques des NRO et qui serait exprimée de façon différentielle dans différents types de NRO [119]. Depuis, des séquences homologues de SNMP1 ont été identifiées chez d'autres espèces de lépidoptères comme *B. mori*, *H. virescens* et *M. sexta*, présentant entre elles autour de soixante dix pour cent d'identité en acides aminés [120]. Une seconde SNMP homologue mais assez divergente a aussi été identifiée chez *M. sexta* [80] [120]. Cette protéine ne présentait que vingt cinq pour cent d'identité avec MsexSNMP1 et a donc été appelé MsexSNMP2. Malgré ces divergences de séquence chez *M. sexta*, les deux gènes sont fortement et spécifiquement exprimés au niveau de la membrane dendritique des NRO, et cela au même moment du développement (en fin de nymphose) que d'autres gènes olfactifs (OBP, RO, ODE), ce qui correspond à l'acquisition de la capacité olfactive. Finalement, chez les lépidoptères, tous les gènes codants pour des SNMP caractérisés jusqu'ici, s'expriment uniquement dans les NRO des antennes mâles et femelles, et cela au même moment de la différenciation fonctionnelle des antennes jusqu'aux stades adultes. Cette expression spécifique des gènes de cette famille dans les dendrites des NRO au moment où ceux-ci sont capables de détecter les odeurs suggère fortement que ces protéines seraient impliquées dans le processus olfactif, mais la fonction précise de ces gènes reste encore à élucider. Chez le ver à soie, une seule SNMP est connue à ce jour, BmSNMP1 [120].

IV.3.2. Une fonction olfactive qui reste à déterminer

D'après les premières études phylogénétiques menées sur cette famille, les SNMP d'insectes constituent en fait un sous-groupe de la famille de récepteurs CD36 de vertébrés avec lesquels ils sont homologues [120]. Les membres de la famille CD36 caractérisés jusqu'ici chez les vertébrés seraient impliqués dans divers processus cellulaires tels que la phagocytose, l'endocytose ou encore la réception et le transport de molécules lipidiques [121]. Les protéines de cette famille seraient en effet capables de lier de petites protéines lipidiques (glycoprotéines) comme le cholestérol, des complexes protéines / lipides ou encore de transporter des molécules lipidiques à travers les membranes cellulaires. En se basant sur les rôles potentiels de ces protéines chez les vertébrés, plusieurs hypothèses ont été avancées sur les fonctions olfactives potentielles des SNMP chez les lépidoptères, y compris par des interactions avec les ligands odorants hydrophobes ou d'autres protéines présentes dans les sensilles [120]. Les SNMP pourraient, par exemple, interagir avec les complexes OBP/ligand,

contribuant à la réception ou au largage des ligands lipophiles à proximité des RO, former des hétérodimères avec les RO conventionnels comme cela a déjà été montré chez d'autres types de récepteurs, ou encore interagir avec d'autres protéines impliquées dans la transduction du signal comme par exemple un autre élément des NRO, la guanylyl-cyclase (GC), identifiée chez *B. mori*, et qui pourrait être impliquée dans la terminaison du signal par endocytose des complexes OR/ligand [122].

Les séquences de SNMP de lépidoptères ont également été utilisées pour identifier des séquences homologues potentielles de cette famille chez d'autres espèces d'invertébrés comme la drosophile et le nématode *Caenorhabditis elegans* [120]. Quatorze séquences homologues potentielles ont ainsi été retrouvées dans le génome de la drosophile et quatre dans celui de *C. elegans*. On ne sait pas encore pour l'instant si certains de ces gènes pourraient être impliqués dans le processus de réception olfactive. Trois protéines ont été caractérisées chez la drosophile, mais aucune ne présentait une localisation neuronale [123] [124] [125].

Cependant, très récemment et toujours chez la drosophile, un de ces gène, *DmelCG7000* (ou *DmelSNMP*), a été démontré comme essentiel dans la détection du cVA, une phéromone volatile produite par les mâles, par les NRO de la sensille trichoïde exprimant OR67d, le récepteur spécifique du cVA [126]. Ce gène de drosophile, codant pour une protéine légèrement plus proche des SNMP1 que des SNMP2 de lépidoptères, est exprimé dans une population de NRO impliquée dans la détection de la phéromone, indiquant clairement un rôle potentiel dans la perception phéromonale. Les auteurs de cette étude ont avancé l'hypothèse selon laquelle *DmelSNMP* agirait de concert avec les RP pour rendre disponible les molécules de phéromone au niveau des dendrites des NRO. Il pourrait donc s'agir d'un cofacteur tenant un rôle fondamental dans la détection phéromonale par les RP chez les insectes (figure 16).

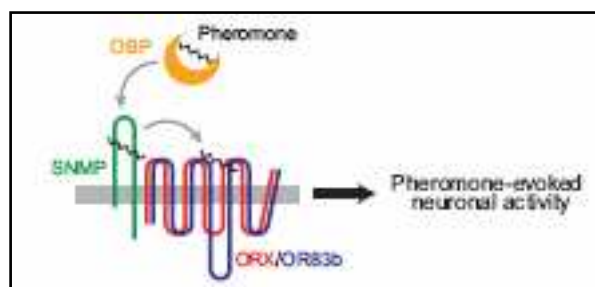


Figure 16. Mécanisme d'action proposé pour les SNMP dans la prise en charge du ligand odorant après son transport par les OBP et avant l'interaction avec les RO. (D'après [126].

IV.4. La dégradation et/ou l'inactivation du signal chimique par les Odorant-Degrading Enzymes (ODE)

La terminaison du signal joue un rôle primordial dans la dynamique très rapide de la réponse des NRO à une stimulation olfactive. Pour assurer cette fonction essentielle, il y aurait au niveau périphérique un mécanisme d'inactivation rapide du signal, nécessaire pour répondre à des stimulations périodiques fréquentes. Plusieurs mécanismes pourraient assurer cette étape de terminaison du signal : l'internalisation des ligands par les RO après stimulation, la séquestration des ligands dans la poche de liaison hydrophobe des OBP (rôle de scavenger), ou la dégradation enzymatique rapide des ligands par des Odorant-Degrading Enzymes (ODE) présentes dans la lymphé sensillaire.

IV.4.1. Une diversité d'activités enzymatiques de dégradation antennaires

Chez les lépidoptères, le phénomène de dégradation enzymatique antennaire des phéromones est connu depuis plus de trente ans chez *B. mori* [127] et *Trichoplusia ni* [128] [129]. Depuis ces études pionnières, de nombreuses activités enzymatiques antennaires ont été montrées par des approches biochimiques chez d'autres espèces de lépidoptères, activités principalement de type estérase [56] [130], aldéhyde oxydase (AOX) [131] [132], alcool oxydase/déshydrogénase [133] et époxyde hydrolase [134]. Les phéromones étant généralement constituées de molécules à fonction acétate, alcool, aldéhyde ou époxyde, il n'est guère étonnant de retrouver des activités enzymatiques antennaires spécifiques de ces composés. Ainsi, la première ODE caractérisée par une approche biochimique fut l'estérase sensillaire d'*A. polyphemus*, ApolSE [56], dont le composé phéromonal majoritaire est un acétate, le (E,Z)-6,11-hexadécadienyl acétate (E6,Z11-16 :Ac). Ces études menées chez des espèces de lépidoptères nocturnes utilisant des composés phéromonaux de nature chimique variée ont permis de démontrer la présence de différents types enzymatiques antennaires capables de dégrader les composés phéromonaux des espèces considérées. Cela est particulièrement bien illustré chez *A. polyphemus* dont l'estérase et l'AOX, toutes deux extracellulaires et localisées dans les sensilles olfactives, seraient capable de dégrader les deux composés phéromonaux à fonction acétate et aldéhyde de façon très spécifique [130] [132].

Cependant, la vitesse de la dégradation enzymatique des phéromones est controversée. En effet, des résultats contradictoires ont été obtenus chez différentes espèces au cours d'études sur les cinétiques de dégradation *in vitro* qui ont permis d'estimer le temps de demi-vie de composés phéromonaux en présence d'extraits antennaires bruts ou de Pheromone-Degrading Enzymes (PDE) spécifiques plus ou moins purifiée. Ainsi, chez *A. polyphemus*, ces études ont montré que la demi-vie *in vivo* de la phéromone pouvait être estimée autour de 15 ms [130], ce qui est compatible avec une inactivation rapide du signal. De même, cette demi-vie de la phéromone a été estimée chez *M. sexta* autour de 0,6 ms [131]. Par contre, chez le ver à soie, des études ont démontré une dégradation enzymatique *in vitro* lente du Bol par les extraits antennaires, autour de 2,5 min, clairement incompatible avec l'implication des ODE dans le processus de terminaison rapide du signal [133]. Ces résultats chez *B. mori* laissaient donc supposer que d'autres protéines pourraient jouer un rôle dans ce processus (OBP, RO). Plus récemment, la caractérisation biochimique et moléculaire d'une estérase impliquée spécifiquement dans la dégradation d'un composé phéromonal à fonction acétate chez *A. polyphemus*, ApolPDE, a permis de démontrer *in vitro* que la protéine recombinante est capable de dégrader le composé acétate avec des paramètres cinétiques compatibles avec une inactivation très rapide du signal [135]. Ces travaux ont permis de renforcer l'hypothèse

d'un rôle prépondérant des PDE dans la terminaison rapide du signal, sans toutefois exclure un rôle complémentaire des OBP, RO ou encore des SNMP, même si cela doit encore être démontré.

De façon surprenante, peu d'études s'intéressent aux ODE comparé aux RO et aux OBP. Bien que les propriétés cataboliques des PDE envers les phéromones soient maintenant démontrées chez certains lépidoptères, très peu de données moléculaires sont disponibles. Les activités enzymatiques étant corrélées à la nature chimique des composés phéromonaux à dégrader, selon les espèces, différentes classes d'enzymes peuvent être impliquées. Ainsi, chez les Lépidoptères, des estérases chez *A. polyphemus* (ApolPDE, ApolSE et ApolIE) [56] [130] [136], *M. brassicae* (MbraEST) [137], *S. littoralis* (SlitEST) et *S. nonagrioides* (SnonEST) [138], des enzymes à cytochrome P450 chez *M. brassicae* (CYP4S4, CYP4L4, CYP9A13 et CYP4G20) [139], une aldéhyde oxidase chez *M. brassicae* (MbraAOX) [140] et une glutathion-S-transférase (GST) [141] ont été clonées et séquencées.

IV.4.2. Dégradation de la phéromone chez le ver à soie

Chez *B. mori*, deux activités enzymatiques ont été mises en évidence dans les extraits antennaires, une activité de type alcool oxidase/déshydrogénase et une autre de type aldéhyde oxidase, les enzymes correspondantes pouvant naturellement être impliquées respectivement dans la dégradation de l'alcool (Bol) [133] et de l'aldéhyde (Bal) [132]. De manière intéressante, des traces de Bal ont été identifiées parmi les produits de dégradation du Bol par des extraits antennaires, indiquant que le composé minoritaire pourrait constituer également un intermédiaire de catabolisme du composé majoritaire [133]. Les propriétés biochimiques des enzymes pouvant dégrader le Bal ont été étudiées de façons plus approfondies chez *M. sexta* [131], *A. polyphemus* et *B. mori* [132]. Chez ces trois espèces, une bande antennaire-spécifique correspondant à une AOX potentielle a été identifiée par électrophorèse protéique native et révélation colorimétrique. Cette enzyme a été trouvée dans les antennes des deux sexes mais de façon plus abondante chez les mâles. Ces AOX antennaires sont des enzymes solubles, possédant une masse moléculaire autour de 150 kDa et qui s'organisent en dimères chez *M. sexta*. De plus, elles se sont révélées être localisées dans la lymphe sensillaire chez *A. polyphemus* et *M. sexta* (non testé chez *B. mori*). Chez les trois lépidoptères étudiés, l'enzyme correspondante a été démontrée comme capable de dégrader des composés aldéhydiques à longue chaîne, incluant le Bal. Cependant, les PDE correspondantes n'étaient pas encore isolées au moment de ma thèse.

Les PDE pourraient constituer de bonnes cibles moléculaires pour des approches intégrées de lutte biologique contre les insectes nuisibles. En effet, les phéromones sont constituées de différents odorants qui sont perçus comme un mélange précis par les NRO des sensilles olfactives, donc l'inhibition d'une PDE pourrait modifier la composition du mélange dans la lymphe sensillaire et ainsi perturber la perception de la phéromone toute entière et par conséquent la reproduction. Cependant, les PDE appartenant à des familles de protéines largement distribuées chez les animaux (estérases, P450), seuls des inhibiteurs spécifiques d'une PDE pourraient être utilisés, afin d'éviter de perturber d'autres cibles. A titre d'exemple, les résultats obtenus chez le coléoptère *Phyllopertha diversa* ont montré, en utilisant un inhibiteur d'enzymes à cytochrome P450 olfactifs, qu'il était possible de bloquer *in vivo* la réception de la phéromone chez les mâles [142]. Chez cette espèce, une activité enzymatique antennaire de dégradation de la phéromone basée sur l'implication de P450 spécifiquement exprimés chez les mâles avait été identifiée [143]. Cependant, les P450 étant extrêmement répandus dans le règne vivant, il n'est guère envisageable de cibler cette famille

enzymatique sans perturber d'autres processus physiologiques chez l'espèce cible ainsi que chez de nombreuses espèces non cibles.

Etudier la diversité et la spécificité des ODE appartenant aux différentes classes enzymatiques devrait contribuer à une meilleure compréhension de l'implication de ces protéines dans la dégradation et/ou l'inactivation des molécules odorantes, et particulièrement des phéromones. Cela nécessite donc d'en caractériser de nouvelles, aux niveaux moléculaire, biochimique, et fonctionnel.

Chapitre V. L'apport du modèle insecte dans l'étude de la réception olfactive

La comparaison entre les systèmes olfactifs d'insectes et de mammifères montre une organisation analogue, que ce soit au niveau anatomique mais aussi physiologique. Dans les deux cas, les dendrites des NRO sont baignés par un milieu extracellulaire aqueux à la composition particulière et très riche en protéines, la lymphe sensillaire chez les insectes et le mucus nasal chez les mammifères. Les NRO, localisés au niveau de l'épithélium olfactif chez les vertébrés et abrités à l'intérieur des sensilles olfactives chez les insectes, produisent dans les deux cas une cascade de signalisation aboutissant à une dépolarisation membranaire lorsqu'ils sont stimulés par certains ligands odorants [2]. La transduction olfactive produite va générer un signal électrique qui se propage jusqu'à un premier relais synaptique, le bulbe olfactif chez les vertébrés et les lobes antennaires chez les insectes. Ce signal électrique sera ensuite acheminé vers un deuxième centre d'intégration au niveau du cerveau. Les vertébrés, comme les insectes, possèdent des OBP, des RO et des ODE. De plus, les grandes règles régissant la réception olfactive du niveau périphérique vers le cerveau sont elles aussi conservées. Chez les vertébrés comme chez les insectes, un ligand donné peut activer plusieurs RO [144], un type de RO est activé de façon différentielle par plusieurs ligands [144] [145], un NRO n'exprime qu'un seul type de RO et les NRO exprimant le même type de RO convergent tous vers le même glomérule (parfois vers deux glomérules) dans le bulbe olfactif [146]. De la même façon, un glomérule peut être activé par plusieurs ligands et un même ligand peut activer plusieurs glomérules différents.

Néanmoins, le répertoire des RO est nettement plus important chez les mammifères que chez les insectes : on recense en effet plus de 1200 RO chez la souris [147] et environ 400 RO chez l'homme [148] alors que chez les insectes, le nombre de gènes codants pour des RO est généralement beaucoup plus faible, entre 48 chez le ver à soie et 160 chez l'abeille [102] [149]. De la même façon, le nombre de NRO et de glomérules dans le premier relais synaptique sont également plus importants chez les mammifères que chez les insectes : la souris possède en effet plus de deux millions de NRO reliés à environ 1800 glomérules dans le bulbe olfactif alors qu'on recense chez la drosophile environ 1300 NRO reliés à environ 50 glomérules dans le lobe antennaire [50]. Si les systèmes olfactifs de vertébrés et de non-vertébrés présentent donc une organisation tout à fait comparable, celui des insectes présente l'avantage d'être simplifié, miniaturisé et beaucoup plus facilement accessible, que ce soit au niveau de l'antenne ou des lobes antennaires. Si la perception des molécules odorantes s'effectue par des mécanismes conservés entre insectes et vertébrés, alors la compréhension de ces processus chez les insectes permettra certainement de mieux comprendre ce phénomène chez les vertébrés et vice-versa. Cependant, les étapes clés de la réception périphérique sont assurées, dans ces deux taxons, par des protéines partageant les mêmes fonctions (OBP, RO, ODE) mais dont l'origine évolutive serait très différente. Ces convergences fonctionnelles représentent une particularité très intéressante dans l'olfaction et de son évolution dans différents taxons.

Chapitre VI. La spécificité de la réception olfactive : implication des acteurs moléculaires et dynamique temporelle

Les connaissances actuelles sur les bases moléculaires de la réception olfactive périphérique chez les insectes sont illustrées par la figure 17. La communication phéromonale chez les lépidoptères illustre parfaitement la notion de spécificité de la réception olfactive. Dans ce système, des mélanges odorants caractéristiques d'une espèce (les phéromones) vont d'abord être pris en charge, solubilisés, transportés à travers la lymphe sensillaire par des PBP, détectés par des interactions spécifiques avec des RP, et finalement dégradés par des PDE. Chacune de ces trois grandes catégories de protéines pouvant participer à la spécificité de reconnaissance, c'est probablement l'action combinée des trois qui va contribuer au déclenchement (ou non) de la réponse spécifique du mâle à la phéromone émise par la femelle. La combinatoire d'expression différentielle des OBP, RO et ODE (et probablement aussi des SNMP) dans les différents types de sensilles olfactives pourrait ainsi leur conférer une capacité de perception odorante caractéristique, précise, et complètement dépendante de la biologie de l'insecte considéré. En conclusion, il faut souligner la diversité des acteurs moléculaires impliqués dans la réception périphérique mais aussi rappeler que leurs fonctions ne sont pas toujours clairement comprises.

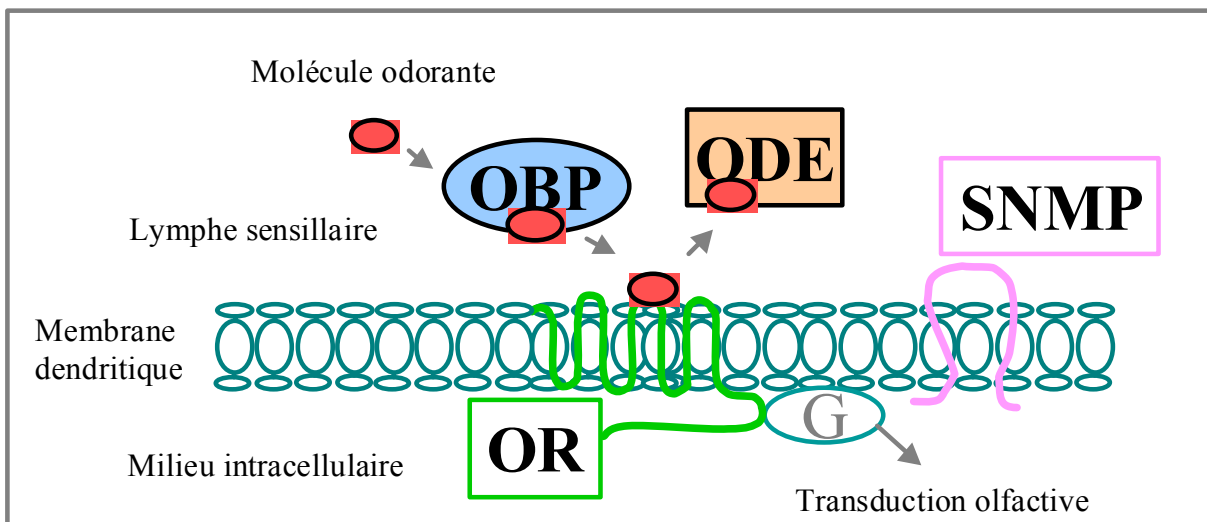


Figure 17. Représentation schématique des événements périphériques assurant la réception du message chimique et sa transformation en signal électrique. Les ligands odorants seraient d'abord solubilisés et transportés par les OBP, jusqu'aux RO, dont l'interaction avec les ligands va déclencher (ou non) une cascade de transduction olfactive initiée par des protéines G. D'autres récepteurs, les SNMP, sont censés intervenir sur les complexes OBP/odorant et/ou sur des composants de la cascade de transduction. Après interaction avec les RO, les odorants vont finalement être dégradés par des ODE. L'inactivation des ligands après interaction avec les RO pourrait aussi être assurée par l'intervention des OBP, des RO ou des SNMP.

Chapitre VII. Conclusion de la première partie

Comme on l'a vu lors de cette introduction bibliographique, le ver à soie est certainement le modèle lépidoptère le plus étudié au niveau de l'olfaction, et pourtant, de nombreuses questions cruciales restent toujours sans réponse :

- Quel est le rôle physiologique du Bal ?

Si le rôle du Bol dans le comportement d'attraction et d'excitation des mâles par les femelles est parfaitement compris, celui du Bal n'est pas encore élucidé. Comme on l'a vu précédemment, le Bal possède un effet inhibiteur sur le comportement d'excitation des mâles, lorsque les deux composés de la phéromone stimulent simultanément les individus [34]. Mais il n'est pas facile de trouver une signification biologique convenable à cette inhibition, car dans la situation naturelle d'une femelle en appel, tous les mâles à proximité vont réagir de façon très sensible et enclencher le comportement typique d'excitation induit par le Bol.

Une hypothèse pourrait être que le Bal ne serait pas un composé de la phéromone de *B. mori*. En effet, identifié dans un extrait de glande femelle [34], ce composé pourrait être en fait un intermédiaire de la biosynthèse du Bol, et donc être présent dans la glande mais non émis. Afin de tester cette hypothèse, nous avons, au tout début de ma thèse, comparé la composition d'extraits hexaniques de glandes à phéromone femelles à celle de collectes d'effluves sur fibres SPME (Solid Phase Micro Extraction) obtenues dans l'environnement immédiat de femelles en appel (en période de production). Ces analyses ont été menées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par Christian Malosse (INRA, Versailles). Elles ont révélé que ni dans les extraits, ni dans les collectes d'effluves, le Bal n'était présent dans notre souche. Ce résultat préliminaire pourrait indiquer que notre souche a perdu ce composé, ou bien remettre en question la composition admise de la phéromone de *B. mori*. Le composé Bal pourrait aussi être détecté par les sensilles trichoïdes phéromonales comme composé hétérospécifique, c'est-à-dire comme un composé phéromonal d'autres espèces (du Bal est présent dans le bouquet phéromonal des femelles *Manduca sexta*, par exemple). La présence, dans une même sensille trichoïde longue, d'un NRO répondant à un composé phéromonal et un NRO répondant à un composé hétérospécifique est en effet un phénomène couramment observé chez les lépidoptères [150]. Cette hypothèse serait cohérente avec un rôle d'inhibiteur comportemental pour ce composé, observé chez *B. mori*.

- Existe-t-il une seule PBP dans les sensilles trichoïdes longues mâles pour transporter les deux composés phéromonaux ?

On sait que la spécificité de liaison des PBP envers différents composés phéromonaux est maintenant très fortement soutenue par des travaux réalisés chez différentes espèces de lépidoptères, et que des études à la fois *in vivo* et *in vitro* ont démontré le rôle sélectif de BmPBP1 dans la solubilisation et le transport du Bol uniquement [72] [71]. Dans ce contexte, la présence dans ces sensilles d'une autre PBP capable d'interagir spécifiquement avec le Bal semble une hypothèse raisonnable. Alternativement, des travaux de modélisation de structure et de prédiction d'affinité ont montré une affinité de liaison similaire de BmPBP1 pour les deux composés phéromonaux [87]. Cette situation, rare chez un lépidoptère, d'une seule PBP connue pour deux ligands phéromonaux identifiés, pourrait-elle s'expliquer par la grande

ressemblance chimique entre les deux composés de la phéromone et la très forte concentration de BmPBP1 dans la lymphé sensillaire ?

- Quelle fonction pour BmPBP1 dans les antennes femelles ?

L'expression de BmPBP1 dans les antennes femelles (Krieger, 1996), alors que les femelles ne répondent pas à leur propre phéromone lors de tests en électrophysiologie [151], et qu'elles n'expriment pas non plus les RP spécifiques indispensables pour la perception de la phéromone est pour l'instant encore inexplicée. Les RP pourraient néanmoins être exprimés de façon extrêmement faible chez les femelles, dans seulement quelques sensilles par exemple, ce qui pourrait être suffisant pour détecter leur phéromone, mais cela reste à démontrer. Il est donc possible que BmPBP1 soit capable d'assurer deux fonctions différentes, la perception de la phéromone (Bol seul ou Bol et Bal) dans les sensilles longues mâles et une autre fonction dans les antennes femelles qui reste encore à découvrir.

- BmPBP1 joue-t-elle un rôle dans l'activation des RP et l'inactivation du signal ?

En dehors de son rôle fortement suggéré dans la solubilisation et le transport du Bol [77], on ne sait pas si BmPBP1 pourrait aussi être impliquée dans l'activation du récepteur au Bol, BmOR1. Si une étude fonctionnelle initiale a montré que la réponse de BmOR1 semblait dépendre à la fois de la phéromone (Bol ou Bal) et du type de PBP utilisé [72], des études plus récentes ont démontré la réponse de ce même RP aux deux composés phéromonaux lorsque ceux-ci ont été solubilisés par un solvant organique (DMSO), en l'absence de BmPBP1 [71] [73].

De même, BmPBP1 pourrait aussi être impliquée dans l'étape d'inactivation du signal en assurant le rôle de scavenger. Cette hypothèse est basée sur la démonstration de l'existence de différentes conformations de la protéine, en fonction du pH [70] ou du potentiel redox chez une PBP d'*A. polyphemus* [88]. BmPBP1 pourrait donc être capable, dans une certaine conformation, de retenir le ligand à l'intérieur de la poche de liaison hydrophobe, ce qui contribuerait à l'inactivation de la molécule, mais les mécanismes précis de cette inactivation potentielle par une PBP restent néanmoins à démontrer.

- Quelle est la spécificité réelle de BmOR1 et BmOR3 envers les ligands phéromonaux ?

Différentes études de caractérisation fonctionnelle des RP de *B. mori*, basées sur des systèmes d'expression différents (oocytes de xénopes, cellules HEK, « empty neurone » de drosophile) ont été menées par différentes équipes afin de caractériser les profils de réponse des deux récepteurs, BmOR1 et BmOR3. Les résultats obtenus sont contradictoires pour BmOR1, qui dans certains systèmes, répondait uniquement au Bol [101] [93], alors qu'il répondait dans d'autres systèmes aux deux composés phéromonaux [71] [73]. Si l'hétérogénéité des systèmes employés pourrait expliquer en partie ces différences, ces résultats pourraient aussi refléter une spécificité plus large pour ces RP.

- Le répertoire actuel des RO est-il complet chez *B. mori* ?

Au cours de ma thèse, les premières séquences de RO mâles-spécifiques ont été publiées [36] [93], suivies d'un inventaire d'une quarantaine de RO identifiés par analyse du génome [102]. Les 48 RO de cette étude représentent-ils le répertoire complet de cette espèce ou d'autres séquences codant pour des RO n'ont pas encore été identifiées ? Lorsqu'on considère le nombre de RO recensés chez d'autres espèces d'insectes (jusqu'à 160 chez l'abeille), ainsi que le nombre de glomérules identifiés dans les lobes antennaires (60 chez *B. mori*), on peut tout à fait imaginer que d'autres gènes codant pour des protéines de la famille de RCPG soient présents dans le génome du ver à soie.

- Existe-t-il des PDE spécifiques chez *B. mori* capables de dégrader le Bol et Bal avec une cinétique compatible avec le comportement d'attraction du mâle ?

La démonstration de la co-existence de deux activités enzymatiques capables de dégrader les deux composés phéromonaux à fonction alcool (Bol) et aldéhyde (Bal) dans les antennes du ver à soie est une preuve de l'existence d'au moins deux PDE chez cette espèce [133] [132]. Ces PDE, qui n'ont pas encore été identifiées au niveau moléculaire, pourraient être impliquées dans l'étape d'inactivation du signal par dégradation enzymatique très rapide de la phéromone, comme cela a été démontré pour une AOX chez *M. sexta* [131] et une estérase chez *A. polyphemus* [130] [135]. Ainsi, ces enzymes pourraient jouer un rôle primordial chez les insectes dans la dynamique de la réponse des mâles à la phéromone émise par les femelles.

- Existe-t-il une seule SNMP chez le ver à soie et quel est son rôle ?

L'implication de la famille des SNMP dans les processus olfactifs périphériques est très fortement suggérée [118]. Chez le ver à soie, un seul membre de cette famille, BmSNMP1, a été identifié dans les antennes, alors que deux SNMP sont recensées chez *M. sexta* [152], et quatorze SNMP potentielles sont présentes dans le génome de la drosophile. Le rôle précis de cette famille de récepteurs n'est toujours pas compris chez les lépidoptères, même si plusieurs hypothèses ont été avancées sur la base des homologies constatées avec les membres de la famille de récepteurs CD36 de vertébrés. Ainsi, les SNMP pourraient être impliquées dans l'activation des RO et/ou dans l'inactivation du signal. Dernièrement, la démonstration de l'implication d'une SNMP de drosophile dans la perception d'un composé phéromonal a permis de mieux comprendre le rôle primordial tenu par un membre de cette famille, et de relancer l'intérêt porté à cette famille de récepteurs chez les lépidoptères [126].

Ce bilan récapitulatif rappelle que les découvertes accumulées depuis les années cinquante sur différents modèles insectes, et en particulier chez *B. mori*, ont permis de donner une première idée de la réception olfactive périphérique et de la transduction du signal jusqu'aux centres intégrateurs du cerveau, mais tellement de choses restent à découvrir et/ou à confirmer dans presque toutes ces étapes que l'étude de ces mécanismes olfactifs a encore de beaux jours devant elle.

Pour avancer par rapport à ces questions posées, le ver à soie constitue encore aujourd'hui un excellent modèle, de par la mine d'informations déjà disponibles, la

disponibilité des séquences génomiques sur Internet, ainsi que l'utilisation possible de la transgénèse pour manipuler génétiquement l'organisme.

Je vais maintenant détailler dans les parties suivantes les objectifs que nous nous sommes fixés par rapport à ces questions posées, puis les principaux résultats que nous avons obtenus sur différentes familles de protéines, en particulier des PBP, SNMP et ODE.

Objectifs de mon travail de thèse

Dans le riche contexte bibliographique précédemment décrit dans la première partie, mon travail avait pour objectif d'apporter des éléments de réponse à certaines des questions soulevées, dans le but de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes olfactifs chez les lépidoptères.

L'objectif principal de ma thèse a consisté tout d'abord à identifier et à caractériser des séquences de gènes olfactifs, notamment phéromonaux, chez le modèle *B. mori*, nouvellement employé comme modèle au laboratoire, en exploitant les données génomiques disponibles sur Internet depuis quelques mois.

Au début de ma thèse, aucune donnée n'était encore disponible sur les RO de lépidoptères, c'est pourquoi nous nous sommes d'abord intéressés à cette famille qui assure un rôle central dans la détection des odeurs. Malheureusement, après seulement quelques mois, deux groupes de recherche indépendants publiaient leurs résultats qui démontraient l'implication de deux gènes de la famille des RCPG, *BmOR1* et *BmOR3* dans l'interaction spécifique avec les ligands phéromonaux Bol et Bal, respectivement. Cette situation difficile illustre bien le climat de concurrence internationale exacerbée sur le modèle ver à soie, concurrence encore accrue depuis la disponibilité des séquences génomiques aux groupes de recherche du monde entier. Conscient de la difficulté à persévérer dans la caractérisation des RP, je décidais de concentrer mes recherches sur d'autres grandes familles de gènes potentiellement impliqués dans la réception phéromonale, en priorité des PBP et des PDE mais aussi des SNMP.

Le travail que j'ai entrepris a consisté à :

1. Identifier des séquences de gènes candidats pertinents, potentiellement impliqués dans les différentes étapes de la réception phéromonale périphérique, par des méthodes bioinformatiques d'analyse du génome.
2. Caractériser moléculairement les candidats les plus prometteurs par des méthodes de biologie moléculaire (extraction ARN, RT-PCR, clonage, Northern-blot, Hybridation *in situ*), afin de définir le profil d'expression de chaque gène candidat au niveau tissulaire et au cours du développement, permettant ainsi d'étayer l'hypothèse sur le rôle olfactif ou non du gène étudié.
3. Mettre au point une approche intégrée et novatrice pour l'étude fonctionnelle des gènes olfactifs basée sur la technique de transgénèse et le transposon piggyBac chez le ver à soie. Cet outil a été développé principalement afin de pouvoir caractériser fonctionnellement chez des lépidoptères des récepteurs olfactifs ou phéromonaux *in vivo*.

Il convient de préciser ici que le développement d'un tel outil biotechnologique prend du temps, mais représente un pari dont les retombées potentielles peuvent être énormes pour le laboratoire en cas de succès. Il n'existe en effet aucun système d'analyse fonctionnelle *in vivo*

disponible sur un modèle lépidoptère pour l'étude des gènes olfactifs. La possibilité d'utiliser la transgénèse sur le modèle ver à soie, à travers une collaboration avec Corinne Royer de l'Unité Nationale Séricicole (UNS), a rendu possible la réalisation d'un tel projet au laboratoire pendant mes trois années de thèse.

Les résultats les plus marquants de mon travail de thèse seront présentés dans deux parties distinctes :

Dans la deuxième partie, je vais reporter l'identification de gènes olfactifs impliqués potentiellement dans la réception des signaux chimiques dans les antennes du ver à soie. Cette partie sera subdivisée en chapitres relatant mes travaux de recherche sur trois grandes familles de protéines olfactives : les PBP, les SNMP et les ODE. Les matériels et méthodes, commun aux trois familles étudiées, seront présentés dans le premier chapitre.

Dans la troisième partie, je vais relater la mise au point d'un outil d'analyse fonctionnelle *in vivo* basé sur la technique de transgénèse chez le ver à soie, depuis la création des lignées transgéniques jusqu'aux premiers essais fonctionnels basés sur l'enregistrement de la réponse électrophysiologique des individus transgéniques après stimulation odorante.

**DEUXIEME PARTIE. IDENTIFICATION ET
CARACTERISATION MOLECULAIRE DE GENES
IMPLIQUES DANS LA RECEPTION PHEROMONALE
PERIPHERIQUE CHEZ LE VER A SOIE, *Bombyx mori***

CHAPITRE I : Matériel et méthodes

CHAPITRE II : Deux nouvelles PBP exprimées dans les antennes mâles et femelles

CHAPITRE III : Une nouvelle SNMP au profil d'expression particulier

CHAPITRE IV : Deux AOX antennaires potentiellement impliquées dans la dégradation de la phéromone

Chapitre I. Matériel et méthodes

I.1. Bioinformatique et analyse des séquences génomiques

Des séquences protéiques connues de gènes de d'insectes appartenant aux différentes familles de gènes olfactifs (PBP, SNMP, ODE) ont été récupérées à partir de la banque de données GenBank (NCBI, National center for Biotechnology Information) puis ont été utilisées pour rechercher des séquences nucléotidiques présentant des similitudes dans les bases de données génomiques du ver à soie par la technique du TBLASTN (recherche de séquences protéiques dans une base de données nucléotidique traduite dans les six phases) [153], en utilisant le plus souvent les paramètres par défaut. Les deux sites Internet <http://silkworm.genomics.org.cn/> (Beijing Genomics Institute, BGI, China) et <http://kaikoblast.dna.affrc.go.jp/> (Silkworm Genome Research Program, SGRP, National Institute of Agrobiological Sciences, Japan) ont été utilisés pour ces recherches. Les séquences protéiques d'autres espèces qui ont été utilisées, ainsi que leurs numéros d'accèsion GenBank, sont reportées dans le tableau 1 ci-dessous.

A. PBP

Agrotis ipsilon, Aips-PBP1, AY301985 ; Aips-PBP2, AY301986 ; *Agrotis segetum*, Aseg-PBP1, AF134292 ; Aseg-PBP2, AY301987 ; *Antheraea pernyi*, Aper-PBP1, X96773 ; Aper-PBP2, X96860 ; Aper-PBP3, AJ277265 ; *Antheraea polyphemus*, Apol-PBP1, X17559 ; Apol-PBP2, AJ277266 ; Apol-PBP3, AJ277267 ; *Argyrotaenia velutinana*, Avel-PBP, AF177641 ; *Bombyx mori*, Bm-PBP1, X94987 ; *Choristoneura fumiferana*, Cfum-PBP, AF177642 ; *Choristoneura murirana*, Cmur-PBP, AF177647 ; *Choristoneura parallela*, Cpar-PBP, AF177648 ; *Choristoneura pinus*, Cpin-PBP, AF177650 ; *Choristoneura rosacaena*, Cros-PBP, AF177655 ; *Epiphyas postvittana*, Epos-PBP1, AF416588 ; Epos-PBP2, AF411459 ; *Helicoverpa armigera*, Harm-PBP, AJ278992 ; Harm-PBP3, AAO16091 ; *Helicoverpa assulta*, Hass-PBP, AAW65077 ; Hass-PBP3, ABB91374 ; *Helicoverpa zea*, Hzea-PBP, AF090191 ; *Heliothis virescens*, Hvir-PBP1, X96861 ; *Lymantria dispar*, Ldis-PBP1, AF007867 ; Ldis-PBP2, AF007868 ; *Mamestra brassicae*, Mbra-PBP1, AF051143 ; Mbra-PBP2, AF051142 ; *Manduca sexta*, Msex-PBP1, AF323972 ; Msex-PBP2, AF117588 ; Msex-PBP3, AF117580 ; *Ostrinia furnicalis*, Ofur-PBP, AAD39442 ; *Ostrinia nubilalis*, Onub-PBP, AF133643 ; *Pectinophora gossypiella*, Pgos-PBP, AF177656 ; *Sesamia nonagrioides*, Snon-PBP1, AAS79922 ; Snon-PBP2, AAS49923 ; *Spodoptera exigua*, Spexi-PBP1, AAU95536 ; Spexi-PBP2, AAS55551 ; *Spodoptera litura*, Slitu-PBP1, AAZ22339 ; Slitu-PBP2, AAY21255 ; *Synanthedon exitiosa*, Sexi-PBP, AF177657 ; *Yponomeuta cagnagellus*, Ycag-PBP, AF177661.

B. SNMP

Lépidoptères :

Antheraea polyphemus, ApolSNMP1, U95026 ; *Bombyx mori*, BmSNMP1, AJ251958 ; *Helicoverpa armigera*, HarmSNMP1, AF462067 ; *Heliothis virescens*, HvirSNMP1, AJ251959 ; *Manduca sexta*, MsexSNMP1, AF323588 ; MsexSNMP2, AF323589.

Diptère :

Drosophila melanogaster, DmelSNMP (DmelCG7000), NM142696.

C. ODE : Se reporter à la publication jointe au troisième chapitre de cette partie.

Tableau 1. Liste des PBP (A), SNMP (B) et ODE (C) utilisées lors de l'analyse phylogénétique et des recherches par Blast.

Les scaffolds (ou portions de chromosomes) génomiques contenant des séquences putatives ont ensuite été analysés « manuellement » pour rechercher des séquences de gènes codant potentiellement pour des protéines d'intérêt. Cette analyse manuelle incluait la recherche des jonctions intron/exon, afin de reconstituer la phase ouverte de lecture réelle de chaque gène. La reconstitution des séquences complètes a été réalisée par comparaison des séquences putatives entre elles et avec des séquences connues, à l'aide des outils classiques d'alignement et de manipulation de séquences (traduction d'une séquence nucléotidique dans les six phases, calcul des pourcentages d'identité entre deux séquences...). Le programme BioEdit (Ibis Bioscience, USA) a également été utilisé pour créer des bases de données personnalisées pour les recherches par BLAST, ainsi que pour la manipulation de séquences. La disponibilité des séquences génomiques dans deux bases de données indépendantes a permis, d'une part de compléter plusieurs séquences, qui manquaient dans l'une des deux, et d'autre part de vérifier l'intégrité de séquences « douteuses » dues à un séquençage imparfait. Les scaffolds utilisés pour reconstituer les séquences complètes ou partielles des différents gènes identifiés au cours de ma thèse seront présentés séparément dans les trois chapitres à venir.

La reconstitution des séquences de gènes olfactifs chez le ver à soie a présenté des degrés de complexité divers. En effet, si les PBP étaient présentes sur le même scaffold et leur structure analysée de façon parfaite par le BGF, les AOX ont nécessité plusieurs mois d'analyse, de par leur distribution sur plusieurs fragments génomiques et une structure intron/exon autrement plus complexe.

Les séquences en acides aminés résultantes ont ensuite été analysées avec MWALC (Infobiogen) et SignalP 3.0 (Bendtsen, 2004) et alignées dans CLUSTALW (NPS@IBPC). Ces alignements protéiques ont été utilisés pour créer des fichiers d'entrée destinés à l'analyse phylogénétique. Des arbres non racinés basés sur la méthode du neighbor-joining ont été construits à l'aide du programme MEGA 3.1 [154], en utilisant les paramètres par défaut. La robustesse des arbres phylogénétiques a été estimée par un calcul de Bootstrap au cours de 1000 répliques.

I.2. Préparation des insectes et prélèvement des tissus

Les vers à soie de la souche Nistari ont été fournis par l'Unité Nationale Séricicole (INRA, Lyon, France), au stade chrysalide ou au 5^{ème} stade larvaire, et maintenus à 22°C jusqu'à leur émergence.

Les antennes ainsi que divers autres tissus mâles et femelles (pattes, ailes, thorax, abdomens, cerveaux et glandes phéromonales femelles) ont été collectés dans de l'azote liquide deux à trois jours après émergence puis stockés à une température de -80°C jusqu'à utilisation.

Pour étudier l'expression au cours du développement, quelques générations complètes ont été élevées au laboratoire sur feuilles de mûrier, puis les antennes (ou les têtes entières pour les chenilles) ont été disséquées sur les stades suivants : œufs, chenilles de 1^{er}, 3^{ème} et 5^{ème} stade, chrysalides à cinq jours, trois jours et un jour avant l'émergence, adultes à l'émergence et adultes âgés de trois jours.

Les antennes utilisées en hybridation *in situ* (HIS) ont été fixées directement après dissection dans du formaldéhyde à 4% toute la nuit à 4°C et à l'obscurité, puis rincées avec du PBS et conservées dans du méthanol jusqu'à utilisation.

La méthode de prélèvement des sensilles trichoïdes longues mâles, développée par mes soins au laboratoire, est décrite dans la partie matériel et méthodes de la publication jointe au chapitre IV de cette partie [155].

I.3. Extraction des ARN totaux et préparation des ADNc

Les ARN totaux des différents tissus ont été extraits à l'aide du réactif TRIzol (Invitrogen) et traités à la DnaseI (Promega) pour éviter les contaminations par de l'ADN génomique. Les ADNc simples brins ont été synthétisés à partir de 5µg d'ARN en utilisant la transcriptase reverse M-MLV (Clontech) et le protocole fourni dans le kit Advantage RT-for-PCR kit (Clontech).

La totalité des ARN totaux extraits des sensilles trichoïdes longues mâles a été utilisée pour synthétiser l'ADNc selon le même protocole que ci-dessus.

Les mêmes préparations d'ADNc ont été utilisées pour étudier l'expression des PBP et des AOX au cours du développement et dans les sensilles trichoïdes longues mâles (non réalisé pour les SNMP).

Un protocole normalisé d'extraction d'ARN et de RT-PCR sur une antenne a également été développé au laboratoire et utilisé pour une étude d'expression sur les lignées transgéniques générées par transgénèse. Les conditions sont décrites dans le chapitre matériel et méthodes de la quatrième partie.

I.4. Amplifications PCR, clonage et séquençage des gènes candidats

Les ADNc antennaires ont été utilisés en PCR pour générer des fragments correspondants aux différents gènes identifiés par les méthodes bioinformatiques, en utilisant des amorces spécifiques désignées d'après les séquences génomiques de chaque gène (tableau 2). Le séquençage des différents gènes clonés nous a alors permis de vérifier les frontières intron/exon réelles et ainsi de confirmer nos prédictions bioinformatiques.

Les conditions de PCR utilisées pour cloner ces gènes ont varié en fonction des amorces utilisées et de la taille des fragments à amplifier (tableau 2).

Les fragments obtenus ont ensuite été clonés dans le plasmide pCRII-TOPO (Invitrogen), puis ont été séquencés (Genome Express, Grenoble, France).

Quatre gènes nouvellement identifiés et codant potentiellement pour deux PBP, *BmPBP2* et *BmPBP3*, et deux AOX, *BmAox1* et *BmAox2*, ont été clonés de cette manière au cours de mon travail de thèse (non réalisé pour *BmSNMP2*).

I.5. Etude des profils d'expression dans différents tissus et au cours du développement par RT-PCR et Northern-blot

Les ADNc des différents tissus ont été utilisés en PCR avec les amorces spécifiques des différents gènes afin d'étudier leur profil d'expression (tableau 2). Les mêmes paires d'amorces spécifiques ont également été utilisées pour amplifier les différents gènes à partir d'ADNc antennaires prélevés à différents stades de développement ainsi que d'ADNc de sensilles trichoïdes longues mâles. L'amplification du gène *BmRpL8* qui code pour une protéine ribosomale (N° d'accèsion GenBank AY769276) a servi de contrôle positif des matrices d'ADN afin de vérifier leur qualité et les quantités d'ADNc utilisées (condition de

PCR RpL8 : 35 cycles d'amplification à une température d'hybridation de 50°C). Les amplifications ont ensuite été visualisées sur des gels à 1,5% d'agarose, les images acquises sur un système d'imagerie digitale FLUORchem TM 8000 (Alpha Innotech Corporation), et préparées sous Photoshop 5.0 (Adobe).

Pour les Northern-blot, des quantités équivalentes d'ARN totaux (20µg) d'antennes mâles et femelles ainsi que de pattes, ailes, thorax et abdomens mâles ont été déposées sur des gels à 1% de formamide puis transférées sur une membrane de nylon chargée positivement. Les sondes marquées à la Digoxigenin (Dig), spécifiques des gènes étudiés (PBP ou AOX) ont été produites par PCR en utilisant les amorces spécifiques déjà décrites avec le PCR Dig labelling mix (Roche). Pour les PBP, la membrane contenant les ARN a d'abord été hybridée par la sonde anti-BmPBP2 à 42°C puis par la sonde anti-BmPBP3 à la même température, selon le protocole décrit dans [137]. Les hybridations ont été révélées par des anticorps anti-Dig couplés à une peroxydase HRP (Horse Radish Peroxidase), puis détectés par du NBT/BCIP (NitroBlueTetrazolium/BromoChloroIndoloPhosphate), substrat de la HRP, par une réaction enzymatique. Les conditions utilisées pour le Northern-blot sur les AOX sont décrites dans la publication. Les tailles des transcrits ont été estimées grâce au molecular weight marker II (Roche). Une sonde dirigée contre le gène ribosomal *BmRpL8* a été utilisée afin de vérifier la quantité et la qualité des ARN déposés. L'hybridation de cette sonde a été réalisée à 50°C.

A.

BmPBP2 up: 5'-GGACTTCCAAGACACCTC-3'

BmPBP2 do: 5'-GAAGCTGCAAGTTGTACTAG-3'

PCR PBP2 : 35 cycles (clonage) et 30 cycles (tissue-spécificité et développement) à une température d'hybridation de 56°C et pour un temps d'élongation de 40s

BmPBP3 up: 5'-GGGGTAGTTGGTGCCAGA-3'

BmPBP3 do: 5'-TGCAGCTACCTCAGTGGC-3'

PCR PBP3 : 35 cycles (clonage) et 28 cycles (tissue-spécificité et développement) à une température d'hybridation de 58°C et pour un temps d'élongation de 40s

B.

BmSNMP2 up: 5'ATGCGTGCTAAATATACAAA-3'

BmSNMP2 do: 5'CGAATGTACTTTACTTGTAT-3'

PCR SNMP2 : 34 cycles (tissue-spécificité) à une température d'hybridation de 52°C et pour un temps d'élongation de 1min et 30s

Tableau 2. Séquences des amorces et conditions utilisées pour le clonage des PBP et les études de tissue-spécificité des PBP (A) et de BmSNMP2 (B). (up, amplifie le brin sens ; do, amplifie le brin antisens). Pour les AOX, se reporter au matériel et méthodes de la publication au chapitre IV de cette partie.

I.6. Etude de la localisation sensillaire par hybridation *in situ* (HIS)

Les inserts contenus dans les plasmides ayant servi au clonage des deux nouvelles PBP ou des deux nouvelles AOX ont été amplifiés par PCR avec les amorces M13 forward et M13 reverse. Les produits d'amplification ont ensuite été utilisés pour produire des sondes

ARN marquées à la Dig par la méthode de transcription *in vitro*, en utilisant les ARN polymerases SP6 et T7 (Promega) et en suivant les instructions du kit Riboprobe Combination System SP6/T7 (Promega). L'ISH sur antennes entières a été réalisée à une température d'hybridation de 65°C selon le protocole décrit dans [156]. Les coupes d'antennes entières ont été faites au microtome, après inclusion des antennes dans des blocs de résine polymère.

Les antennes du ver à soie étant bipectinées et possédant une épaisse cuticule, un protocole d'ISH sur coupes cryostat a été mis au point au laboratoire, afin de permettre une meilleure pénétration des sondes dans les tissus antennaires. Les coupes d'antennes ont été réalisées sur un cryostat CM1510S (Leica). De nombreux essais d'ISH sur coupes cryostat ont été réalisés dans différentes conditions, permettant de définir un protocole assez efficace, décrit plus précisément dans la partie matériel et méthodes de la publication jointe au chapitre IV de cette partie [155].

A l'issue de ces protocoles, les images d'ISH ont été visualisées sur un microscope DM4000 B (Leica), et préparées sous Photoshop 5.0 (Adobe).

I.7. Modélisation des structures tridimensionnelles de BmPBP2 et BmPBP3

Travail réalisé en collaboration avec Jérôme Golebiowski (Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes (LCMBA), Nice, France).

Les structures tridimensionnelles de BmPBP2 et BmPBP3 ont été prédites par des méthodes bioinformatiques de « simulation dynamique moléculaire », par homologie avec la structure de BmPBP1, déterminée à partir des résultats fournis par les expériences de rayons X [74] et de RMN [157]. Ces simulations ont été menées en utilisant le programme AMBER 8 [158], afin de comparer les structures tridimensionnelle des trois PBP.

I.8. Prédiction théorique d'affinité de BmPBP1 envers le Bol et le Bal

Travail réalisé en collaboration avec Jérôme Golebiowski (Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes (LCMBA), Nice, France).

La sélectivité potentielle de BmPBP1 envers les composés phéromonaux Bol et Bal a été estimée d'un point de vue théorique basé sur le principe de « transformation alchimique » lors de « simulations dynamiques moléculaires ». Cette technique repose sur l'estimation des valeurs d'énergies libres de liaison d'une protéine envers deux ligands potentiels [159] [160]. Les calculs de différences entre les énergies libres de liaison de BmPBP1 liée au Bol et au Bal ont été réalisés, afin de prédire l'affinité de cette protéine envers les deux composés de la phéromone.

Chapitre II. Deux nouvelles PBP exprimées dans les antennes mâles et femelles

II.1. Introduction et contexte

La caractérisation d'OBP et de PBP chez les insectes est très largement documentée, en particulier chez les lépidoptères, comme on l'a vu dans la partie introductive dédiée à cette famille protéique. Si les rôles de solubilisation et de transport des molécules odorantes par ces protéines sont maintenant bien documentés, leur implication dans la reconnaissance sélective des différents odorants est encore contestée.

Chez les insectes, la présence d'une diversité d'OBP au sein d'une même espèce appuie l'hypothèse d'un rôle différentiel dans le transport des odorants. L'existence de plusieurs types de PBP chez une même espèce a été démontrée chez de nombreux lépidoptères. Par exemple, trois PBP sont recensées chez les espèces *A. polyphemus* et *A. pernyi* (Saturnidae) [78] [161] [162] ainsi que chez *M. sexta* (Sphingidae) [79] [80], alors que deux PBP sont recensées chez les espèces *M. brassicae* [81], *H. virescens* [82] et *S. nonagrioides* [83]. J'ai d'ailleurs participé à une étude décrivant l'identification et la caractérisation moléculaire de deux nouvelles PBP dans les antennes de la noctuelle *S. nonagrioides* dans le cadre de la thèse de Federica De Santis, ce travail ayant donné lieu à une publication dont je suis co-auteur [83].

La présence de différents sous-types de PBP chez des espèces utilisant plusieurs composés phéromonaux distincts laisse penser que ces protéines pourraient jouer un rôle dans la détection sélective des composés phéromonaux en se liant et en transportant de façon spécifique les différents composants de la phéromone jusqu'aux récepteurs [4]. Plusieurs études soutiennent cette hypothèse en démontrant une certaine spécificité de liaison entre PBP et différents composés phéromonaux. C'est le cas par exemple chez *L. dispar* [163] [86], *A. pernyi* [164] et *A. polyphemus* [85]. Ainsi, en situation de compétition *in vitro*, chacune des trois PBP d'*A. polyphemus* se lie préférentiellement à l'un des composés phéromonaux [165] [84].

Comme on l'a vu, chez *B. mori*, une PBP, BmPBP1 et deux GOBP, BmGOBP1 et BmGOBP2 étaient déjà décrites dans les antennes [166] [66]. Au début de ma thèse, BmPBP1 constituait donc la seule PBP identifiée chez les mâles dans les sensilles trichoïdes longues sensibles à la phéromone, et son implication dans la reconnaissance du composé phéromonal Bol avait été démontrée, à la fois par des études fonctionnelles *in vivo* [72] et *in vitro* [71]. Ces études, couplées avec le fait que la phéromone émise par la femelle soit constituée de deux composés, Bol et Bal [34], suggèrent fortement l'existence d'une autre PBP exprimée dans les sensilles trichoïdes longues mâles et interagissant de façon spécifique avec le Bal.

Une certaine diversité de PBP chez le ver à soie avait déjà été mise en évidence à l'échelle protéique dans des extraits d'antennes par une étude utilisant des anticorps dirigés sélectivement contre les trois PBP d'*A. polyphemus*. Cette approche a permis de révéler la présence par Western-blot de quatre bandes immunoréactives chez les mâles et de deux chez les femelles [167]. Ces différentes bandes pourraient représenter différentes conformations de la même protéine BmPBP1, hypothèse corrélée par la flexibilité structurale de cette protéine sous l'influence du pH [70] [74], mais elles pourraient aussi refléter une réelle diversité de PBP dans cette espèce.

Dans ce contexte, mon travail sur les PBP chez *B. mori* avait pour but en premier lieu, d'identifier d'autres PBP dans les sensilles trichoïdes longues qui seraient potentiellement capable de transporter le Bal, et en même temps, d'évaluer plus précisément la diversité de cette famille multigénique chez cette espèce. La toute récente disponibilité des données génomiques [11] [12] représentait alors un outil idéal pour rechercher de nouveaux gènes putatifs codant pour des PBP par des approches bioinformatiques. L'identification de nouvelles PBP chez *B. mori* devrait contribuer à une meilleure compréhension du rôle sélectif de liaison par les protéines de cette famille.

II.2. Résultats et Discussions

II.2.1. Identification de deux nouvelles PBP : organisation génomique, structure génétique et évolution

En effectuant des recherches par TBLASTN sur les séquences génomiques en utilisant des séquences connues de PBP d'autres espèces d'insectes, nous avons identifié trois séquences de gènes codant pour des protéines potentielles présentant une forte homologie avec la famille des PBP. Un scaffold génomique unique (scaffold 010822, BGI) contenait les trois séquences. L'un de ces gènes (Bmb030597, BGI) codait pour l'unique PBP déjà identifiée [166] [66], 1996) et qui a été renommée BmPBP1. Les deux autres gènes codaient pour des protéines qui avaient été classées comme « pheromone/odorant-binding protein » par le site Internet du BGI. Les séquences génomiques de ces deux gènes ont été analysées manuellement pour vérifier les structures intron/exon prédites par l'analyse BGF (BGI Gene Finder). Le programme CLUSTALW a été utilisé pour aligner les séquences protéiques afin de vérifier l'annotation des gènes et leur classification dans la famille des PBP.

Ces vérifications ont été confirmées par le clonage et le séquençage des ADNc correspondants qui validaient la structure génétique prédite, ainsi que par une recherche en BLASTP (recherche de séquences protéiques dans une base de données protéique) dans la base de données NCBI en utilisant les deux nouvelles séquences. Sur la base d'homologies de séquences, ces deux protéines potentielles ont été classées dans la famille des PBP et ont été nommées BmPBP2 (Bmb030598, BGI) et BmPBP3 (Bmb030599, BGI), d'après l'ordre d'apparition sur le cluster.

L'organisation génomique de ces trois gènes codant pour des PBP est conservée, avec une structure à trois exons et deux introns, la même orientation, une phase ouverte de lecture (du premier ATG au codon stop) entre 1400 et 2000 nucléotides (1623pb pour *BmPBP1*, 1904pb pour *BmPBP2* et 1419pb pour *BmPBP3*) et une conservation de la phase d'insertion des introns entre ces trois gènes, le premier étant inséré dans la phase 0 alors que le deuxième est inséré dans la phase 1. La taille du cluster depuis l'ATG de *BmPBP1* jusqu'au codon stop de *BmPBP3* est de 8525 nucléotides (figure 18).

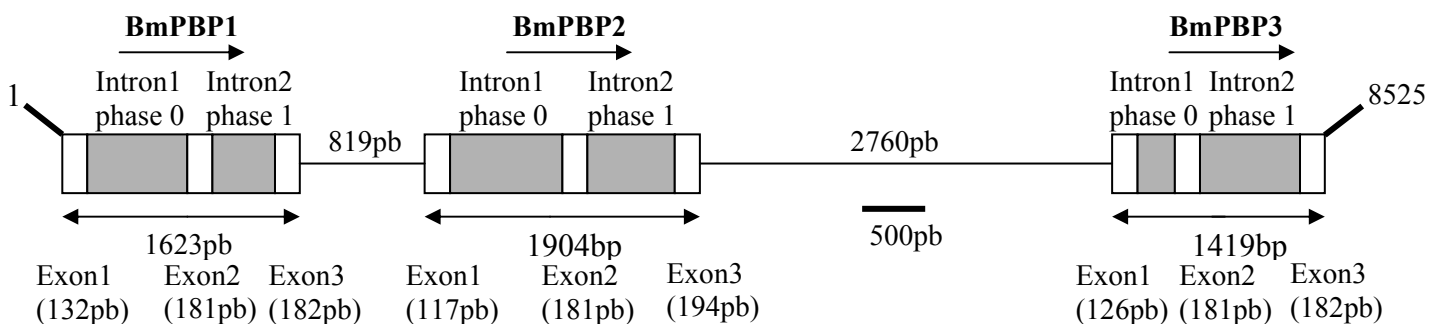


Figure 18. Représentation schématique de l'organisation génomique des PBP de *B. mori*. Les exons sont en blanc, les introns en gris et les séquences intergéniques sont représentées par un trait simple. Les trois gènes sont localisés sur le scaffold 010822 (BGI). La phase d'insertion des deux introns et l'orientation sont indiquées pour chaque gène.

Une analyse par le programme SignalP 3.0 a révélé que les séquences protéiques déduites des deux nouvelles PBP possédaient un peptide signal de 17 (BmPBP2) et 20 acides aminés (BmPBP3). Les protéines déduites sont des polypeptides de 145 acides aminés avec une masse moléculaire de 16.7 kDa et un pI (point isoélectrique) de 5.97 pour BmPBP2, et de 142 résidus avec une masse moléculaire de 15.9 kDa et un pI de 6.47 pour BmPBP3. Ainsi, il s'agit potentiellement de petites protéines solubles et secrétées, et possédant un point isoélectrique acide, caractéristiques compatibles avec celles des PBPs d'insectes. De plus, les deux séquences contiennent les six résidus cystéines en position conservées caractéristiques de cette famille: C19, C50, C54, C97, C108, C117 (figure 19). Le pourcentage d'identité en acides aminés est de quarante six pour cent entre BmPBP2 et BmPBP3, cinquante six pour cent entre BmPBP2 et BmPBP1 et de quarante neuf pour cent entre BmPBP3 et BmPBP1.

PBP1	MSIQGQIALALMVNMAVGSVDASQEV	MKNLSLNFGKALDECKKEMTLTD	AINEDFY	NFWK	*
PBP2	MKLQ-VVLVVLTVEMVCG----	SRDVMTNLSIQFAKPLEACKKEMGL	TE	TVLKD	FYNFWI
PBP3	MARY-NIVVAVLVLVGVVG-ARG	SSEAMRHIATGFI	IRVLD	ECKQELGLTD	HLTDMYHFWK
		*	*		*
PBP1	EGYEIKNRETGCAIMCLSTKLNMLD	PEGNLHHGNAMEFAK	KHGADE	TMAQQ	LIDIVHGCE
PBP2	EDYEFTDRNTGCAILCMSKKLELMD	GDYNLHHGKAHEFARKHGADE	TMA	QLVDLI	HGCS
PBP3	LDYSMMTRETGCAIICMSKKLDLI	DGDGKLHHGNAQAYALKHGAATE	VA	AKLVE	VIHGCE
		*	*		
PBP1	KSTPANDDKCIWTLGVATCFKAEI	HKLNWAP	SMDVAVGE	ILAEV	----
PBP2	QSVATMPDECERTLKVAKCFIAE	IHKLKWAP	DVELLMAEVL	NEV	SWKS
PBP3	KLHESIDDQCSRVLVAVAKCFRT	GVHELHWAPKLD	VIVGE	VMTE	I----

Figure 19. Alignement des séquences protéiques de BmPBP1, BmPBP2 et BmPBP3 à l'aide du programme Clustal W (1.8). Les séquences des peptides signaux sont soulignées et les résidus conservés sont grisés. Les positions conservées des six cystéines sont indiquées par des astérisques.

Une analyse phylogénétique de la famille des PBP a ensuite été réalisée, comparant les séquences protéiques des trois PBP de *B. mori* avec d'autres PBP identifiées chez d'autres espèces de lépidoptères. L'arbre phylogénétique, obtenu par la méthode du neighbor-joining, indique clairement que les PBP connues de lépidoptères sont séparées en trois groupes distincts basés sur les identités de séquences en acides aminés (figure 20). Les trois PBP du ver à soie se retrouvent chacune dans un de ces trois groupes en compagnie d'autres PBP d'autres espèces. Leurs séquences sont donc plus proches de celles d'autres espèces qu'elles ne le sont entre elles. Cette situation, avec une PBP à l'intérieur de chaque groupe, laisse penser que l'on ait identifié la totalité des membres de cette famille chez le ver à soie.

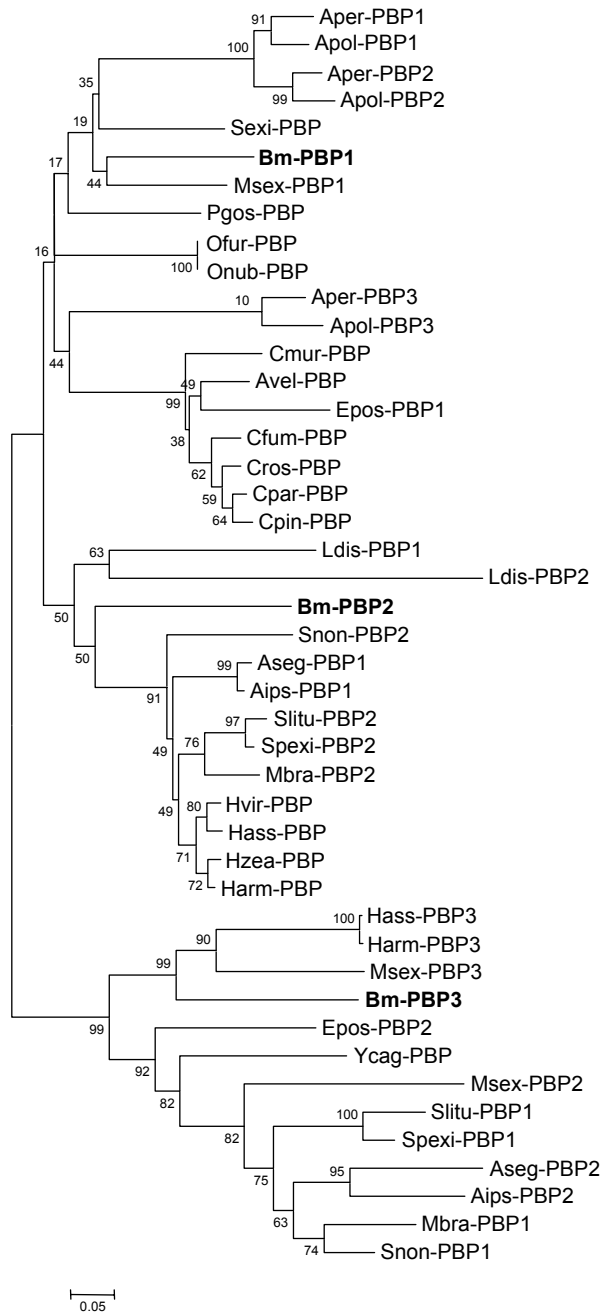


Figure 20. Analyse phylogénétique des PBP de lépidoptères par la méthode du neighbor-joining. Les valeurs de bootstrap (en pourcentages) basé sur 1000 répliquions sont indiquées pour chaque nœud. Les séquences de PBP qui ont été utilisées pour construire l'arbre sont indiquées dans le tableau 1.

D'un point de vue évolutif, les trois gènes sont localisés à proximité sur une même portion chromosomique, ils partagent la même structure intron/exon et notamment les mêmes positions des sites d'insertion des introns, ce qui indique qu'ils sont probablement issus d'un événement de duplication de gènes, comme cela a déjà été observé pour des OBP d'autres espèces [168]. Les données apportées par l'analyse phylogénétique suggèrent que l'existence de ces trois groupes distincts de PBP chez les lépidoptères pourrait résulter de cet événement de duplication qui aurait donc eu lieu chez un ancêtre commun, avant la radiation des différentes espèces de lépidoptères, ce qui explique que l'on retrouve les trois types de PBP chez de nombreuses espèces.

II.2.2. BmPBP2 et BmPBP3 sont exprimées de façon différentielle dans les antennes mâles et femelles

Si les analyses bioinformatiques réalisées sur les deux nouvelles séquences les classent de façon certaine dans la famille des PBP, cela reste néanmoins insuffisant pour conclure à un rôle dans la réception des molécules odorantes ou plus particulièrement des phéromones pour les protéines correspondantes. En effet, il faut d'abord prouver que ces gènes sont bien exprimés dans des structures dédiées à la détection des molécules odorantes. C'est pour cela que la seconde étape de mon travail a consisté à étudier l'expression tissulaire de *BmPBP2* et *BmPBP3* par RT-PCR. Outre les antennes des deux sexes, d'autres tissus non olfactifs ont été utilisés. Les ADNc ont d'abord été testés avec le gène contrôle *BmRpL8* et ont montré des niveaux similaires de signal amplifié (figure 21).

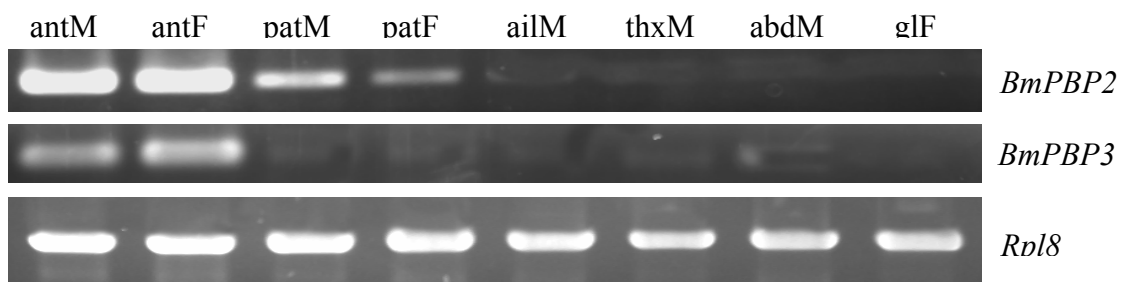


Figure 21. Etude de l'expression tissulaire en RT-PCR de *BmPBP2* et *BmPBP3* dans différents tissus de *Bombyx mori* : antennes (ant), pattes (pat), ailes (ail), thorax (thx), abdomens (abd) et glande à phéromone (gl). M, mâles ; F, femelles. La qualité des ADNc a été contrôlée par amplification du gène ribosomal ubiquitaire *BmRpL8*.

Les deux nouveaux gènes codant pour des PBP apparaissent fortement exprimés dans les antennes des deux sexes et non exprimés dans tous les autres tissus testés, à l'exception d'un signal faible détecté dans les pattes des deux sexes pour *BmPBP2*. L'analyse par Northern-blot a confirmé que les deux nouveaux gènes identifiés sont spécifiquement exprimés dans les antennes des deux sexes, avec là encore un signal *BmPBP2* très faible détecté dans les pattes mâles. Les tailles des deux transcrits, en dessous de 1500 nucléotides, sont en accord avec les estimations précédentes sur la taille des ARNm d'autres PBP, dont *BmPBP1* [66]. Cette technique a permis en outre d'estimer plus précisément l'expression différentielle entre les antennes mâles et femelles. Ainsi, l'intensité du signal *BmPBP2* est globalement équivalente dans les antennes des deux sexes, alors que l'intensité du signal *BmPBP3* est beaucoup plus importante dans les antennes femelles (figure 22).

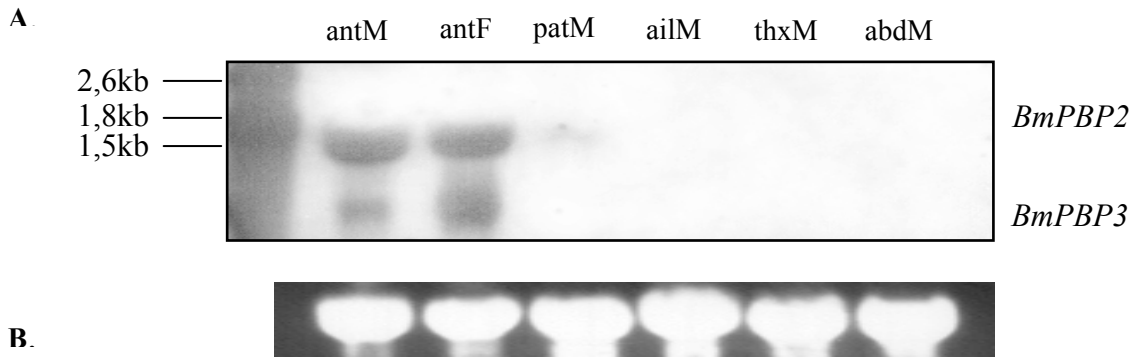


Figure 22. Etude de l'expression tissulaire en Northern-blot de *BmPBP2* et *BmPBP3* dans différents tissus. **A.** Membrane hybridée avec les sondes antisens *BmPBP2* et *BmPBP3*: antennes (ant), pattes (pat), ailes (ail), thorax (thx) et abdomens (abd). M, mâles ; F, femelles. **B.** Vérification de la qualité et de la quantité des ARN transférés sur la membrane sous lumière UV.

L'expression temporelle de *BmPBP2* et *BmPBP3* dans les antennes, étudiée par RT-PCR au cours du développement, a révélé que ces deux gènes sont exprimés à partir de la fin du stade nymphal, environ un jour avant l'émergence des adultes, avec un maximum chez l'adulte (figure 23). Cette expression temporelle est en accord avec les résultats obtenus avec les PBP de *M. sexta* [79] [168]. Cette expression en fin de nymphose et tout au long du stade adulte est corrélée à la maturation fonctionnelle du système olfactif et suggère une voie de régulation commune pour les gènes impliqués dans la détection odorante et/ou phéromonale chez les papillons adultes.

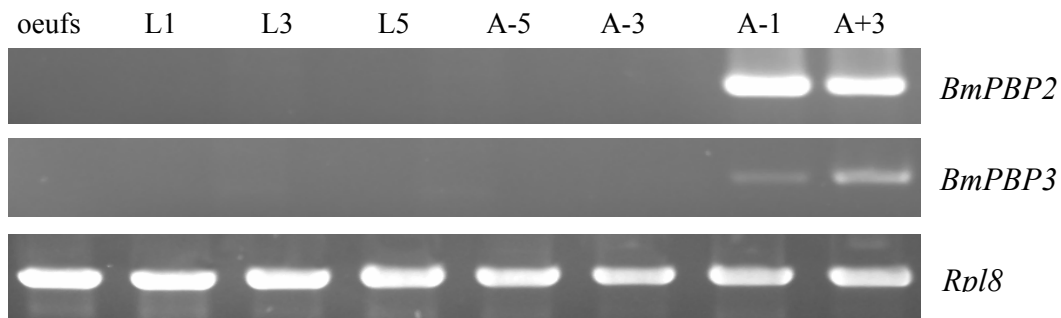


Figure 23. Etude de l'expression tissulaire en RT-PCR de *BmPBP2* et *BmPBP3* au cours du développement. L, larves de premier (1), troisième (3) et cinquième stade (5) ; A, adultes cinq jours (-5), trois jours (-3), un jour avant émergence (j-1) et trois jours après émergence (+3).

La localisation plus précise des deux transcrits au sein de l'antenne mâle a ensuite été étudiée par la technique d'hybridation *in situ*, après avoir mis au point un protocole sur coupes au cryostat de ce tissu particulier qu'est l'antenne. L'hybridation des sondes sens, utilisées comme contrôle négatif, sur les sections transversales et longitudinales d'antennes mâles n'a donné aucun signal visible (non montré) alors que les hybridations avec les sondes antisens dirigées contre les ARNm spécifiques de *BmPBP2* ou *BmPBP3* ont révélé des signaux clairement restreints au niveau du champ sensillaire des branches latérales, sans aucun signal du côté des écailles (figure 24). De plus, le marquage a été observé dans les deux cas à la base des sensilles olfactives, suggérant un rôle olfactif potentiel pour les deux PBP.

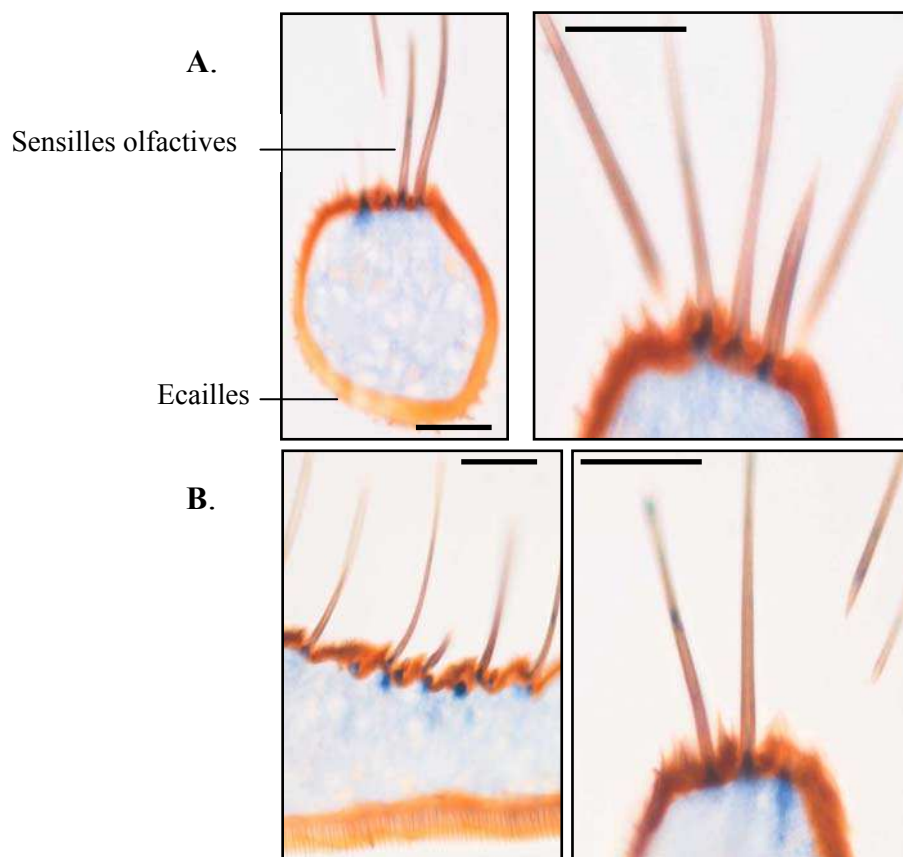


Figure 24. Etude des patrons d'expression de *BmPBP2* (A.) et *BmPBP3* (B.) par hybridation *in situ* sur des sections transversales et longitudinales de branches secondaires d'antennes mâles. Echelle : 25 μm .

Malheureusement, il est très difficile de discriminer les différents types de sensilles en microscopie photonique, ce qui nous a empêché d'établir une corrélation entre un type sensillaire particulier et l'expression de *BmPBP2* et *BmPBP3*, et en particulier de localiser l'expression de ces deux gènes dans les sensilles longues répondant au Bol et au Bal. Pour remédier à cette situation, j'ai développé une technique de RT-PCR sur sensilles trichoïdes longues mâles isolées. L'ADNc préparé à partir d'une extraction de ces sensilles a servi de matrice PCR pour les trois PBP de *B. mori*. De façon extrêmement surprenante, seul le gène *BmPBP1*, dont la localisation spécifique dans ces sensilles longues, sensibles à la phéromone,

était déjà connue, a été amplifié (figure 25). Aucune amplification des deux autres gènes codant pour des PBP n'a été observée. Les protéines correspondantes sont donc probablement localisées dans d'autres types de sensilles antennaires que nous n'avons pas pu étudier par RT-PCR en raison de leurs petites tailles. En effet, lors de la collecte des sensilles sous microscope, les sensilles courtes pouvaient correspondre soit à des types sensillaires courts, soit à des sensilles longues cassées, ce qui aurait biaisé les résultats. Cette absence d'expression suggère fortement que ces deux nouvelles PBP ne seraient probablement pas impliquées dans la réception de la phéromone et ne pourraient donc en aucun cas être spécialisées dans la reconnaissance spécifique du Bal ou du Bol dans les sensilles longues. Ces résultats ont été depuis confirmés par une étude en hybridation *in situ* en double-marquage, où l'expression des deux nouvelles PBP apparaît clairement associée à un type sensillaire différent des sensilles longues chez le mâle [169].

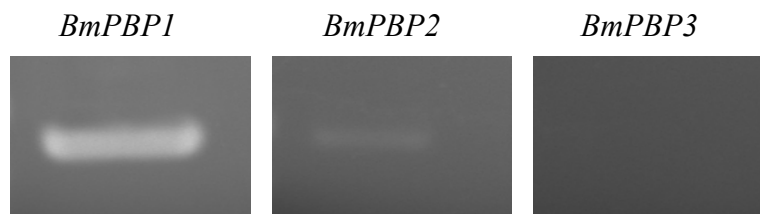


Figure 25. Etude de l'expression de *BmPBP1*, *BmPBP2* et *BmPBP3* sur ADNc de sensilles trichoïdes longues mâles. La qualité du cDNA a été testée par amplification du gène ribosomal *RpL8* (voir matériel et méthodes de la partie AOX et figure correspondante dans la publication).

Il faut noter que la présence chez *B. mori* de trois PBP sur une même région chromosomique (organisation en cluster) ne veut pas dire que ces gènes soient régulés de la même façon et donc nécessairement exprimés dans les mêmes types sensillaires. En effet, comme cela a déjà été montré pour un autre cluster d'OBP, contenant une PBP et une GOBP2 chez *M. sexta*, les deux gènes s'exprimaient de façons très différentes, dans différents types de sensilles, indiquant l'existence de mécanismes régulateurs qui gouvernent finement l'expression de ces gènes à l'intérieur d'un type sensillaire précis [168].

Il est surprenant de constater que ces deux nouvelles PBP, en raison de leur localisation dans d'autres types de sensilles que les sensilles trichoïdes longues, ne peuvent à priori pas être impliquées dans la réception de la phéromone. Chez les mâles, *BmPBP2* et 3 pourraient participer, dans un (des) type(s) sensillaire(s) indéterminé(s), à la réception de molécules odorantes non phéromonales, à moins que des composés phéromonaux encore inconnus ne soient émis par les femelles en appel, ce qui paraît tout à fait improbable.

Ces résultats sont tout de même confortés par de nouvelles données biochimiques qui laissent penser que *BmPBP1* pourrait lier les deux composés phéromonaux avec la même affinité. En effet, lors d'un test de liaison *in vitro* en situation de compétition Bol/Bal, la protéine recombinante montre une affinité de liaison comparable envers ces deux molécules [87]. De plus, dans la même étude, des calculs empiriques d'énergies libres de liaison couplés avec une simulation virtuelle de liaison de la protéine montrent également que *BmPBP1* ne ferait aucune discrimination entre le Bol et le Bal. Les auteurs concluaient de leurs expériences que la reconnaissance spécifique des deux composés phéromonaux devait donc

probablement être assurée par les interactions spécifiques avec leurs récepteurs associés. Il serait toutefois intéressant de réaliser une étude similaire *in vitro* mais en utilisant une protéine native et pas recombinante, afin de confirmer ces observations. En effet, les résultats de calculs d'énergies libres de liaison sont à relativiser, car leur interprétation s'avère différente selon les auteurs, ce qui pourrait remettre en cause cette seule preuve de non-spécificité, comme nous allons le voir au paragraphe suivant.

Malgré ces résultats contradictoires, et contrairement à ce qui est observé chez d'autres espèces de lépidoptères, en l'absence de nouveaux gènes codant pour des PBP exprimées dans les sensilles longues sensibles à la phéromone, on peut émettre l'hypothèse que BmPBP1 soit la seule PBP exprimée dans ces sensilles trichoïdes longues chez les mâles, et qu'elle puisse interagir avec les deux composés de la phéromone. Néanmoins, il n'est pas impossible qu'une autre PBP, pas encore identifiée jusqu'ici, soit présente dans ces sensilles. L'échec des recherches bioinformatiques pourrait s'expliquer si les données génomiques analysées s'avèrent en fait incomplètes, la portion de chromosome contenant cette séquence hypothétique pouvant avoir échappée aux deux analyses réalisées par les équipes du BGI et de Kaiko. Ou alors, la méthode utilisée, à savoir l'utilisation de séquences homologues pour l'analyse par Blast, est peut-être inadéquate si ce gène hypothétique présentait une trop grande divergence de séquence avec les autres PBP connues, ce qui semble improbable au vu de la relative homogénéité de cette famille. Seules des approches biochimiques pourraient permettre de confirmer cette hypothèse. Il serait par exemple intéressant de recommencer l'expérience réalisée en Western-blot sur des extraits antennaires mâles et femelles [167], mais en utilisant cette fois des anticorps dirigés spécifiquement contre les trois PBP connues maintenant chez le ver à soie. Ainsi, on pourrait vérifier si, parmi les quatre bandes identifiées chez les mâles, trois d'entre elles correspondent bien à BmPBP1, 2 et 3, la dernière pouvant alors être considérée comme une nouvelle PBP encore non identifiée jusqu'ici, et qui pourrait donc correspondre à celle que nous attendions. Un séquençage N-terminal de cette protéine pourrait alors prouver l'existence d'une quatrième PBP dans les antennes mâles. Les deux bandes identifiées chez les femelles par cette étude pourraient correspondre aux deux nouvelles PBP identifiées dans ce travail et qui sont fortement exprimées dans les antennes femelles.

II.2.3. Modélisation des structures tridimensionnelles et prédiction théorique d'affinité

Travail réalisé en collaboration avec Jérôme Golebiowski (Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes (LCMBA), Nice, France).

Les structures tridimensionnelles théoriques de BmPBP2 et 3 ont été construites par homologie avec la structure connue de BmPBP1, par la méthode de prédiction bioinformatique de « simulations dynamiques moléculaires » basées sur le logiciel AMBER 8 [158]. La comparaison par superposition des structures résultantes a révélé une grande conservation structurale de ces trois protéines (figure 26), malgré le fait qu'elles ne partagent qu'environ cinquante pour cent d'identité entre elles. Les trois édifices, en complexes avec le composé phéromonal Bol, choisi arbitrairement comme ligand hydrophobe, sont constitués de sept hélices alpha formant la poche de liaison interne hydrophobe, confirmant la grande homologie déjà entrevue pour les OBP de lépidoptères [67]. Néanmoins, même si les structures exhibent globalement la même forme, certaines régions ont montré une plus grande flexibilité structurale durant les simulations, causée par des différences dans les séquences d'acides aminés. Par exemple, la cavité interne de BmPBP2 semble plus profonde et mieux

protégée de la phase aqueuse externe que chez les deux autres, ce qui semble affecter la position du ligand. Comprendre la signification de ces (légères) différences de structure dans l'affinité de ces protéines pour différents ligands devrait permettre à terme de prédire, sur la base de séquences d'acides aminés, quel ligand serait le plus efficacement pris en charge par une PBP donnée. C'est en effet par le biais d'interactions spécifiques (liaisons hydrogènes, électrostatiques) entre certains résidus de la protéine et certains atomes contenus dans le composé phéromonaux, que la spécificité de liaison des PBP réside.

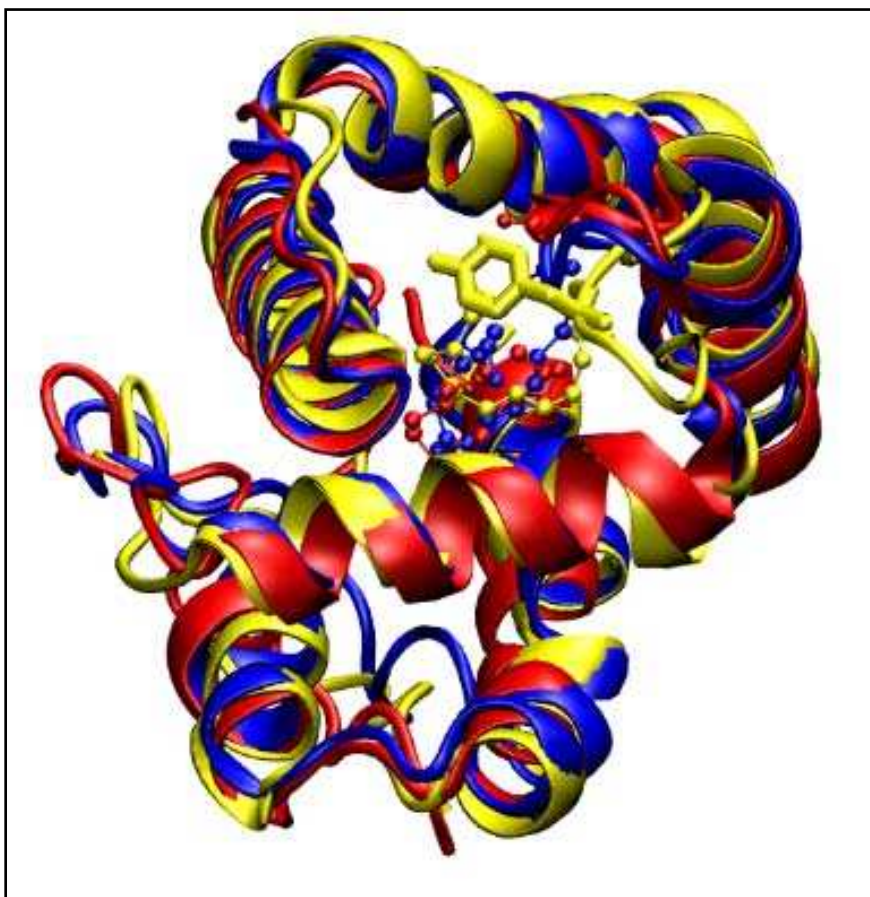


Figure 26. Superposition des structures tridimensionnelles théoriques des trois PBP de *Bombyx mori* liées au bombykol en vue de dessus. **BmPBP1** est en rouge, **BmPBP2** en jaune et **BmPBP3** en bleu. Pour chaque PBP, une molécule de Bol de même couleur que la protéine correspondante est représentée à l'intérieur de la poche de liaison hydrophobe. D'après Jérôme Golebiowski (Laboratoire de Chimie des Molécules Bioactives et des Arômes (LCMBA), Nice, France).

L'affinité de liaison de BmPBP1 pour le Bol et le Bal a été estimée au moyen d'une approche théorique basée sur des calculs de différences d'énergies libres de liaison entre la protéine liée au Bol et au Bal. Cette technique a déjà été utilisée dans l'étude décrite au paragraphe précédent, qui a démontré que BmPBP1 serait capable de lier à la fois le Bol et le Bal [87]. Les valeurs numériques apportées par ce travail montraient que la différence d'énergies libres de liaison entre BmPBP1 lié au Bol (-40 kJ/mole) et au Bal (-45,6 kJ/mole) s'établissait à 5,6 kJ/mole. De la même façon, notre collaborateur Jérôme Golebiowski a estimé cette même valeur entre BmPBP1 lié au Bol (-35,3 kJ/mole) et au Bal (-39,9 kJ/mole) qui s'établissait à 4,6 kJ/mole, ce qui est très similaire par rapport aux résultats précédents

sur la même protéine. L'interprétation de ces valeurs par les deux auteurs s'est révélée par contre complètement différente, l'un considérant que la protéine était capable de lier le Bol et le Bal avec une affinité comparable [87], alors que l'autre considérait que la protéine possédait une plus grande affinité pour le Bol que pour le Bal (nos données), une valeur de -5 kJ/mole étant considérée dans ce cas comme extrêmement significative. Ainsi, l'interprétation de ces résultats s'avère délicate, tant que ces prédictions théoriques ne feront pas l'accord des spécialistes et ne seront pas prouvées par des tests fonctionnels. La question de la liaison sélective de BmPBP1 reste donc encore largement ouverte.

II.2.4. BmPBP2 et BmPBP3 sont fortement exprimées dans les antennes femelles

Les expériences de Northern-blot ont permis de montrer différents niveaux d'expression des trois gènes dans les antennes des deux sexes. Alors que *BmPBP1* est exprimé de façon prédominante dans l'antenne mâle [66] [69], *BmPBP2* est exprimé de façon équivalente dans les antennes mâles et femelles et *BmPBP3* est plus exprimé dans les antennes femelles que dans les antennes mâles. Bien que des PBP de lépidoptères aient déjà été identifiées dans les antennes des deux sexes chez des espèces de Saturniidae, Sphingidae et Bombycidae, ces gènes présentaient toujours une expression supérieure chez les mâles par rapport aux femelles [79] [168]. *BmPBP3* représente donc la première PBP de lépidoptère exprimée de façon dominante dans l'antenne femelle.

Si des femelles d'espèces comme *S. littoralis* [170] ou *M. sexta* [171] ont montré qu'elles étaient capables de percevoir leur propre phéromone, les femelles *B. mori* sont strictement incapables de répondre au Bol et au Bal à des concentrations physiologiques [151]. De plus, les deux nouvelles PBP identifiées ne sont pas exprimées dans les sensilles longues chez le mâle, excluant un rôle dans le transport du Bol et du Bal dans ces sensilles. De fait, BmPBP2 et 3 pourraient, chez les femelles, être impliquées dans la solubilisation et le transport soit de molécules odorantes plus générales, comme des odeurs de plante, soit de composés phéromonaux émis par les mâles et qui n'auraient jamais été identifiés jusqu'ici. Cette découverte de deux PBP exprimées chez les femelles nécessiterait d'ailleurs de vérifier si des structures glandulaires présentes uniquement chez les mâles pourraient correspondre à des sites de production phéromonale.

La forte expression de *BmPBP2* et surtout de *BmPBP3* dans les antennes femelles pourrait être corrélée aux récepteurs olfactifs femelle-spécifiques découverts récemment chez le ver à soie [102]. En effet, au moins deux RO seraient exprimés de façon très majoritaire dans les antennes femelles, *BmOR19* et *BmOR30*, de façon assez similaire aux deux RP exclusivement exprimés dans les antennes mâles, *BmOR1* et *BmOR3*. BmPBP2 et BmPBP3 pourraient ainsi, en combinaison avec un ou plusieurs récepteurs femelle-spécifiques, être impliquées dans la détection d'odorants importants dans le comportement des femelles, tels que des signaux d'oviposition ou encore d'une hypothétique phéromone produite par les mâles. On a vu précédemment que les sensilles trichoïdes longues chez les femelles, qui expriment majoritairement BmGOBP1 et aussi BmGOBP2 [38], détectent par deux NRO très spécialisés soit les molécules d'acide benzoïque et de benzaldéhyde soit le DMH et le linalool, et ce avec une sensibilité et une spécificité comparable à celle des mâles [46]. Les deux derniers composés appartiennent à la famille des terpènes qui est très répandue dans le monde végétal alors que l'acide benzoïque pourrait être un constituant du méconium, la seule substance naturelle identifiée capable de déclencher une réponse du NRO correspondant. L'acide benzoïque et le benzaldéhyde sont aussi des composés typiques de phéromones

aphrodisiaques émises par les mâles chez d'autres espèces de lépidoptères comme *M. brassicae* [47].

On pourrait donc imaginer que les NRO spécialisés dans la détection de ces odorants chez les femelles assurent un rôle à la fois dans la sélection de la plante hôte (signaux d'oviposition par les composés terpènes de plantes) et dans la détection de congénères via le méconium ou de composés phéromonaux aphrodisiaques éventuels. Ces molécules pourraient représenter des ligands possibles pour BmPBP2 et 3, si elles sont effectivement exprimées dans ces sensilles longues (l'analyse du patron d'expression de ces protéines n'ayant pas encore été étudié chez les femelles), mais cela reste bien sûr à démontrer par des approches biochimiques basées sur des tests de liaison *in vitro*. De plus, la localisation précise de ces deux gènes dans les différentes sensilles des antennes femelles devra être analysée, afin d'établir un schéma plus précis de la réception olfactive chez les femelles, domaine largement dédaigné jusqu'ici.

II.2.5 BmPBP2 est faiblement exprimé au niveau des appendices locomoteurs

De façon intéressante et totalement inattendue, *BmPBP2* est aussi (très faiblement) exprimé dans les pattes des deux sexes. C'est le premier cas reporté de l'expression d'un membre de la famille des PBP dans cet organe chez un lépidoptère. Les capacités chimiosensorielles des appendices locomoteurs n'ont jamais été étudiées chez le ver à soie, cependant les pattes de certains insectes sont capables d'assurer de telles fonctions. Chez les lépidoptères, des sensilles ont été observées sur les pattes de certaines espèces, comme chez *M. sexta*, où une diversité de types sensillaires a été observée [172] [173]. Chez une autre espèce, *Lobesia botrana*, les pattes portent, outre de nombreuses structures mécanosensorielles, des sensilles chaetiques de contact qui sont connues pour assurer à la fois des fonctions chimiosensorielles et mécanosensorielles [174]. Néanmoins, le profil de réponse de ces sensilles n'a pas été caractérisé, et on ne sait donc pas si elles pourraient assurer un rôle strict dans la chimioréception des odorants. Chez la drosophile, les pattes, ainsi que d'autres tissus, portent des sensilles impliquées dans la gustation [175] [176]. Ces observations suggèrent que ces appendices chez le ver à soie pourraient jouer un rôle jusqu'alors inconnu dans la réception de certains composés chimiques, mais il faudrait, afin de l'établir, réaliser une étude plus fine des structures sensorielles portées par ces appendices locomoteurs et déterminer leur sensibilité vis-à-vis de molécules odorantes (ou sapides).

On peut également émettre l'hypothèse, si la protéine est réellement traduite dans ces appendices, que BmPBP2 puisse participer au transport de diverses molécules hydrophobes, comme cela est connu pour une autre classe d'OBP, les protéines chimiosensorielles ou CSP [7] [59] [60], et donc avoir un rôle différent d'une implication stricte dans l'olfaction. Si l'on distingue les CSP des OBP chez les lépidoptères par leur expression dans différents tissus chimiosensoriels ou non, il est intéressant de constater que chez plusieurs espèces d'hyménoptères, des OBP ont été identifiées dans les antennes mais aussi dans les pattes et les ailes alors que des CSP ont été identifiées de façon prédominante dans les antennes [177]. Cette situation apparemment inversée reflète peut-être un rôle plus large pour les OBP que celui précédemment proposé. Cela pourrait aussi signifier que, selon les espèces, les rôles des OBP et des CSP ne seraient pas si différents qu'on ne le pense actuellement. Néanmoins, cette étude préliminaire chez des hyménoptères ne prétend pas dresser une liste exhaustive de la famille des OBP et de leurs localisations tissulaires. Donc, une telle inversion des patrons

d'expression entre OBP et CSP est à prendre avec précaution, car de nombreux autres gènes appartenant à ces deux familles n'ont probablement pas été pris en compte dans ce travail.

Finalement, BmPBP2 n'étant pas exprimée chez le mâle dans les sensilles longues, elle ne semble à priori pas impliquée dans la communication phéromonale, et de plus, l'expression observée dans les pattes suggère que cette protéine pourrait avoir un rôle dans le transport d'autres molécules chimiques, odorantes ou non.

Cette faible expression de BmPBP2 dans les pattes des deux sexes est quoi qu'il en soit le premier cas de ce genre observé chez un lépidoptère mais la signification biologique de cette localisation reste encore inexplicée et seules des études fonctionnelles et structurales permettront d'éclaircir ce point.

II.3. Conclusion et perspectives

En exploitant les données génomiques disponibles dans les bases de données, nous avons identifié deux nouveaux gènes codant pour des PBP chez *B. mori*, amenant à un total (peut-être provisoire) de trois PBP chez cette espèce : BmPBP1, BmPBP2 et BmPBP3.

La présence de ces trois gènes sur le même scaffold est une nouvelle preuve de l'organisation génomique en cluster, déjà observée avec des OBP chez *M. sexta* [168], mais aussi avec des RO [102], deux AOX antennaires décrites dans ce manuscrit et des CSP [60] chez *B. mori*.

La conservation de la structure intron/exon des trois gènes, ainsi que leur proximité, laisse penser qu'ils sont probablement issus d'un événement relativement récent de duplication de gènes suivi d'une période diversification génétique.

Les nouvelles PBP du ver à soie partagent toutes les caractéristiques typiques des OBP. Ce sont en effet de petites protéines secrétées, possédants des points isoélectriques acides et six cystéines en position conservées. Afin de vérifier si ces gènes pouvaient être impliqués dans la réception de molécules odorantes, nous avons d'abord étudié leur patron d'expression en utilisant différentes techniques de biologie moléculaire. Nos résultats démontrent que les deux nouvelles PBP sont exprimées dans les antennes mâles et femelles et plus précisément à la base des sensilles olfactives où s'effectue la réception périphérique, indiquant clairement un rôle potentiel dans la réception de molécules odorantes, et peut être de phéromones.

Ces données ont été soumises pour publication à Chemical Senses lors de l'été 2006 et acceptées avec modifications, mais malheureusement, une équipe concurrente publiait dans l'intervalle un article présentant les mêmes résultats [169], ce qui nous a finalement empêchés de publier. Dans cette étude concurrente, la technique d'hybridation *in situ* en double marquage a été utilisée afin d'établir les patrons d'expression sensillaires des deux nouvelles PBP, relativement à BmOR1 et BmPBP1 dans l'antenne mâle. Leurs résultats confirment ceux de notre équipe, *BmPBP2* et *BmPBP3* n'étant pas exprimées dans les sensilles trichoïdes longues mâles.

Mes résultats ont tout de même pu être valorisés avant la publication concurrente par une présentation orale au 7^{ème} Workshop international sur la Biologie Moléculaire et la Génétique des Lépidoptères (Kolympari, Crète, 20-26 août 2006), et la partie modélisation moléculaire des PBP de *B. mori* fera l'objet d'une publication en cours de rédaction et dont je serai co-auteur.

De façon intéressante, chez le mâle, les deux gènes semblaient co-exprimés dans les mêmes cellules, beaucoup moins nombreuses que les cellules marquées par BmPBP1. Les auteurs ont aussi remarqué que le petit nombre de cellules exprimant BmPBP2 et BmPBP3 ressemblait à la densité et à la localisation des sensilles trichoïdes moyennes sur l'antenne. De plus, cette distribution ressemblait fortement à celle de deux autres RP candidats exprimés, bien que faiblement, de façon prédominante chez les mâles, BmOR4 et BmOR5 [36] [93], et dont les ligands ne sont toujours pas connus. Par conséquent, il est possible d'imaginer que les deux nouvelles PBP soient co-exprimées avec ces deux RO dans ce type de sensilles afin de participer chez le mâle à la réception de composés encore inconnus, phéromonaux ou non.

Chez les femelles, l'absence de données sur la localisation sensillaire précise de ces deux PBP nous empêche pour le moment de fournir des hypothèses convaincantes sur les fonctions potentielles de ces deux protéines. Néanmoins, l'expression de ces PBP pourrait être associée à celle des RO femelle-spécifiques, nouvellement identifiés chez le ver à soie [102], dans ce qui constituerait alors un système de détection odorante et/ou phéromonale propre aux femelles.

Les rôles précis de ces deux nouvelles PBP exprimées dans les antennes des deux sexes reste donc encore très mystérieux et seules des études fonctionnelles supplémentaires pourraient permettre d'élucider leur fonction précise.

L'espèce *B. mori* pourrait ainsi représenter un cas à part chez les lépidoptères où une seule PBP serait présente dans les sensilles trichoïdes longues des mâles, et capable de solubiliser seule les deux composés phéromonaux connus, Bol et Bal, alors que deux autres PBP, exprimées dans un autre type sensillaire chez les mâles et surtout de façon abondante dans les antennes femelles, pourraient interagir avec des odorants, phéromonaux ou non, potentiellement cruciaux pour la vie de l'organisme mais qui n'ont pas encore été identifiés jusqu'ici.

Pour décrypter cette situation complexe, il faudrait commencer par établir le patron d'expression sensillaire (ou neuronal) précis de chaque PBP par des études d'hybridation *in situ* dans les antennes des deux sexes. La technique du double marquage avec des RO choisis avec pertinence permettrait ensuite d'associer l'expression de BmPBP2 et 3 avec un RO précis. La caractérisation du profil de réponse électrophysiologique des RO co-exprimés nous renseignerait alors sur le type de ligand à utiliser pour réaliser des tests de liaison *in vitro* avec les PBP. Il sera alors très intéressant de comparer le rôle et la localisation sensillaire de ces protéines chez les mâles et chez les femelles car s'il n'est pas impossible qu'une d'entre elles, BmPBP2, assure la même fonction, dans les mêmes types de sensilles et avec les mêmes RO, dans les antennes des deux sexes, l'autre, BmPBP3, semble plus certainement dédiée à la reconnaissance de composés reconnus spécifiquement par les femelles.

La caractérisation fonctionnelle complète (aux niveaux électrophysiologique et moléculaire) des différents types de sensilles portées par les antennes mâles et femelles devrait permettre de mieux comprendre à la fois le rôle des deux nouvelles protéines identifiées dans ce travail mais aussi l'implication plus précise de cette famille dans les processus de réception olfactive dans les antennes des deux sexes chez le ver à soie.

Chapitre III. Une nouvelle SNMP au profil d'expression particulier

III.1. Introduction et contexte

La découverte relativement récente du premier gène codant pour une protéine de la famille des SNMP chez *A. polyphemus* [118] a permis d'attirer l'attention sur cette très intéressante famille multigénique codant pour des récepteurs à deux domaines transmembranaires et dont les membres pourraient jouer un rôle important dans la réception olfactive périphérique chez les insectes. Plus tard, l'identification de SNMP chez d'autres espèces de lépidoptères a également permis de caractériser une sous-famille divergente chez *M. sexta*, avec MsexSNMP2, permettant d'entrevoir une certaine diversité de cette famille [120]. Par exemple, chez la drosophile, quatorze SNMP potentielles ont été identifiées. Depuis, la découverte très récente de l'implication d'une SNMP dans la réception phéromonale chez cette espèce a constitué le premier cas démontré d'un rôle olfactif essentiel assuré par une protéine de cette famille [126]. Comme on l'a vu en introduction bibliographique, chez le ver à soie, un seul membre de la sous-famille des SNMP1, appelé BmSNMP1, a été identifié jusqu'à présent dans les antennes des deux sexes [120].

Dans ce contexte stimulant, et avec l'accès aux séquences génomiques de *B. mori*, notre objectif était d'appréhender la diversité des SNMP dans sa globalité pour la première fois chez une même espèce de lépidoptère. Cela, afin de mieux comprendre l'implication réelle de cette famille de récepteurs particuliers dans la réception phéromonale et/ou odorante chez cette espèce.

De plus, comme cela a été observé avec ApolSNMP1, ces récepteurs qui sont exprimés de façon très abondante dans la membrane des NRO et peut être même de façon différentielle dans certains NRO [152], pourraient constituer de très bons marqueurs neuronaux, pour réaliser des doubles marquages en HIS par exemple, ou pour utiliser leurs séquences promotrices afin de diriger l'expression d'un transgène précisément dans certains NRO.

Je rapporte ici la découverte dans le génome du ver à soie d'un nouveau membre appartenant à la sous-famille des SNMP2 et par conséquent nommé BmSNMP2, ainsi que l'étude de son patron d'expression. Cette étude préliminaire a révélé que *BmSNMP2* était exprimé dans tous les tissus testés en RT-PCR et pas uniquement dans les antennes, ce qui n'avait jamais encore été observée avec un autre gène codant pour une SNMP chez un lépidoptère jusque là.

III.2. Résultats et discussions

III.2.1. Identification d'un nouveau gène codant pour une SNMP

Toutes les séquences connues de SNMP de lépidoptères ont été utilisées pour rechercher dans le génome du ver à soie [11] [12] des gènes codant pour des protéines homologues par la méthode du TBLASTN. De nombreux fragments génomiques ont été identifiés, contenant potentiellement des séquences putatives partielles codant pour des SNMP (table 3). L'un de ces fragments contenait la séquence presque complète de *BmSNMP1* (Bmb023742, scaffold 007115, BGI) alors que d'autres semblaient contenir des séquences partielles d'un ou de plusieurs gènes codant pour un ou des SNMP appartenant à la classe des SNMP2, dont aucun membre n'avait été encore identifié chez *B. mori*. Ces séquences partielles d'ADN génomique ont été analysées afin de reconstruire le(s) gène(s) correspondant(s). Une séquence composite, reconstituée manuellement à partir des différentes séquences d'ADN génomique, et correspondant à un gène unique a pu être classée dans la sous-famille des SNMP2 et, par conséquent, a été appelée *BmSNMP2*. Ce gène, reconstitué uniquement *in silico* à partir des fragments génomiques, coderait pour une protéine incomplète de 436 acides aminés (figure 27). L'alignement de *BmSNMP2* avec les autres SNMP de lépidoptères a permis de repérer dans sa séquence protéique la présence de trois gaps (ou « trous » dans la séquence) et d'évaluer la taille complète de la protéine *BmSNMP2* autour de 521 acides aminés, ce qui la situe parfaitement dans la gamme des SNMP de lépidoptères.

Gène	Scaffold BGI et Contig/EST Kaiko	Gène BGF	Région protéique correspondante
<i>BmSNMP1</i>	Scaff 007115	Bmb 023742	143 ^{ème} au 521 ^{ème} aa
<i>BmSNMP2</i>	Kaiko CK495998	-	1 ^{er} au 113 ^{ème} aa
	Contig 417286	-	92 ^{ème} au 139 ^{ème} aa
	Scaff 011975	Bmb 032392	148 ^{ème} au 197 ^{ème} aa
	Contig 201671	-	228 ^{ème} au 300 ^{ème} aa
	Kaiko CK556473	-	348 ^{ème} au 405 ^{ème} aa
Scaff 000646	Bmb 003999	406 ^{ème} au 521 ^{ème} aa	

Tableau 3. Annotation des séquences génomiques de *BmSNMP1* et *BmSNMP2*. Les différentes parties du gène *BmSNMP2* ont été identifiées à partir des sites du Beijing Genomics Institute (BGI) (scaffolds BGI et gènes Bmb correspondants) et du Silkworm Genome Research Program (SGRP) (contigs et EST Kaiko). Les séquences protéiques correspondant à ces différentes séquences génomiques sont indiquées (aa : acide aminé).

```

EmorSNMP1 : MQLAKPLKYAATSGIVAVFLGMLFGWVIFPAILKLSQLKKEMALSKKTDVRKMWKIPFALDFKIYLFNFTNAEDVQKGAVPITVKEVGFYFEWKEKVEVE : 100
MsexSNMP1 : MRLARGIKYAVTGAAGVALFGLIFGWVFMFPAILKLSQLKKEMALSKKTDVRKMWKIPFALDFKIYLFNFTNAEDVQKGAAPIVKEVGPYFEWKEKVEIE : 100
HvirSNMP1 : MQLPKELKYAATAGGVALFGLIFGWVLFPTILKLSQLKKEMALSKKTDVRKMWKIPFALDFKVIYFNFTNAEEVQKGAATPILKEIGPYHFDWEKKEVE : 100
HarmSNMP1 : MQLPPELKYAATAGGVALFGLIFGWVLFPTILKLSQLKKEMALSKKTDVRKMWKIPFALDFKVIYFNFTNAEEVQKGAATPILKEIGPYHFDWEKKEVE : 100
MbraSNMP1 : MLLPKELKYAATAGGVALFGLIFGWVLFPTILKLSQLKKEMALSKKTDVRKMWKIPFALDFKVIYFNFTNAEEVQKGAATPILKEIGPYHFDWEKKEVE : 100
SlitSNMP1 : MLLPKELKYAATAGGVALFGLIFGWVLFPTILKLSQLKKEMALSKKTDVRKMWKIPFALDFKVIYFNFTNAEEVQKGAATPILKEIGPYHFDWEKKEVE : 100
ApolSNMP1 : MLLPKPLKYAATAGGVALFGLIFGWVIFVPIILKLSQLKKEMALSKKTDVRKMWKIPFALDFKVIYFNFTNAEDVQKGAAPIVKEVGFYFEWKEKVEVE : 100
EmorSNMP2 : MIAKYTKTIFSVSVAFLVVSIVLATWGFPPKIRKQIQKNVQISNTSKMYDKWVKLPMPLDFKVIYFNFTNAEDVQKGAATPILKEIGPYHFDWEKKEVE : 99
MsexSNMP2 : MIAKSKLFFTSVGLVFLVIVLASWGFPPKIRKQIQKNVQISNTSKMYDKWVKLPMPLDFKVIYFNFTNAEDVQKGAATPILKEIGPYHFDWEKKEVE : 99
MbraSNMP2 : MIAKSKLFFTSVGLVFLVIVLASWGFPPKIRKQIQKNVQISNTSKMYDKWVKLPMPLDFKVIYFNFTNAEDVQKGAATPILKEIGPYHFDWEKKEVE : 99
SlitSNMP2 : MIAKSKLFFTSVGLVFLVIVLASWGFPPKIRKQIQKNVQISNTSKMYDKWVKLPMPLDFKVIYFNFTNAEDVQKGAATPILKEIGPYHFDWEKKEVE : 99

EmorSNMP1 : ENEGNDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVKALDILFRGIIINCDRTFAPAKA : 200
MsexSNMP1 : DHEEDDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVNAMDILFRGVIINCDRTFAPAKA : 200
HvirSNMP1 : DHEEDDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVKALDILFRGMIINCDRTFAPAKA : 200
HarmSNMP1 : DHEEDDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVKALDILFRGMIINCDRTFAPAKA : 200
MbraSNMP1 : DHEEDDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVKALDILFRGMIINCDRTFAPAKA : 200
SlitSNMP1 : DHEEDDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVKALDILFRGMIINCDRTFAPAKA : 200
ApolSNMP1 : DHEEDDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVKALDILFRGMIINCDRTFAPAKA : 200
EmorSNMP2 : GYGNDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVKALDILFRGMIINCDRTFAPAKA : 189
MsexSNMP2 : GYGNDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVKALDILFRGMIINCDRTFAPAKA : 198
MbraSNMP2 : GYGNDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVKALDILFRGMIINCDRTFAPAKA : 198
SlitSNMP2 : GYGNDTIYKKNIDVFLFKPELSPGLTGEVIVMNIIFMMAMALTVYREKPAMLNVAAKAINGIFDSDPSDFEMRVKALDILFRGMIINCDRTFAPAKA : 198

EmorSNMP1 : CTTIKKEAPNGIVFEE--NNQLRFLSFLGVRNNSVDPHVVTVKRGVONVMDVGRVVAIDGKTKMNVWRD--SCNEYQGTGTGTFVPPFLTHK--DRLQSFSGD : 295
MsexSNMP1 : CTAIKKKGAKSIIIEE--NNQLRFLSFLGKLNHTVDSRVVTKRGIKNVMDVGVQVAMDGAPOLEIWN--HCNEYQGTGTGTFVPPFLTHK--DRLQSFSGD : 295
HvirSNMP1 : CTALKKEAVSGLVLEP--NNQFRFSIFGTRNNTIDPHVITVKRGIKNVMDVGVQVAVDVKTEQTIWRD--TCNEYQGTGTGTFVPPFLTHK--DRLQSFSGD : 295
HarmSNMP1 : CTALKKEGVSGLVLEP--NNQFRFSIFGTRNNTIDPHVITVKRGIKNVMDVGVQVAVDVKTEQTIWRD--TCNEYQGTGTGTFVPPFLTHK--DRLQSFSGD : 295
MbraSNMP1 : CTALKKEGVSGLVLEP--NNQFRFSIFGTRNNTIDPHVITVKRGIKNVMDVGVQVAVDVKTEQTIWRD--ACNEYQGTGTGTFVPPFLTHK--DRLQSFSGD : 295
SlitSNMP1 : CTALKKEGVSGLVLEP--NNQFRFSIFGTRNNTIDPHVITVKRGIKNVMDVGVQVAVDVKTEQTIWRD--TCNEYQGTGTGTFVPPFLTHK--DRLQSFSGD : 295
ApolSNMP1 : CTKMKKDAVITGVYEE--NNQFRFSIFGTRNNTIDPHVITVKRGIKNVMDVGVQVAVDVKTEQTIWRD--HCNEYQGTGTGTFVPPFLTHK--DRLQSFSGD : 295
EmorSNMP2 : -----MNRIVSGPYEMV--RGTENLSDLGHVTSYQKRIKMSAWDDOYCGQLNGTDSITFPPLLEDGNIPEKLYTFEED : 259
MsexSNMP2 : CAKLIKADSPPTMRPAEAGVNGYFYSMSHNLNRETGYPYEMV--RGTENLSDLGHVTSYQKRIKMSAWDDOYCGQLNGTDSITFPPLLEDGNIPEKLYTFEED : 297
MbraSNMP2 : CGKIKLPTMRQAE--GSGCYFYSMSHNRNRETGYPYEMV--RGTENLSDLGHVTSYQKRIKMSAWDDOYCGQLNGTDSITFPPLLEDGNIPEKLYTFEED : 296
SlitSNMP2 : CGKIKLPTMRPAE--GANGCYFYSMSHNRNRETGYPYEMV--RGTENLSDLGHVTSYQKRIKMSAWDDOYCGQLNGTDSITFPPLLEDGNIPEKLYTFEED : 296

EmorSNMP1 : LCRSFKPWFQKKTYSYNGIKTNRYVANIGDFAN---DPELQCYD----SPDKCPPKGLMDLYKCIKAPMFSMPHYLEGDPELLKNV--KGLNPNNAHEG : 386
MsexSNMP1 : LCRSFKPWFQKKTYSYNGIKTNRYVANIGDFAN---DPELQCYD----TPEKCPPKGLMDLTKOVKAPMYASMPHFLDADPOMLENV--KGLNPNNAHEG : 386
HvirSNMP1 : LCRTFKPWFQKKTYSYNGIKTNRYVANIGDFAN---DPELQCYD----KPDSCPPKGLMDLAPCMKAPMYASMPHFLDSDPELLTKV--KGLNPNVTOHG : 386
HarmSNMP1 : LCRTFKPWFQKKTYSYNGIKTNRYVANIGDFAN---DPELQCYD----KPDSCPPKGLMDLAPCMKAPMYASMPHFLDSDPELLTKV--KGLNPNVTOHG : 386
MbraSNMP1 : LCRSFKPWFQKKTYSYNGIKTNRYVANIGDFAN---DPELQCYD----DPEKCPPKGLMDLAPCIKAPMYASMPHFLDSDPELLKNV--KGLNPNNAHEG : 386
SlitSNMP1 : LCRSFKPWFQKKTYSYNGIKTNRYVANIGDFAN---DPELQCYD----QPDKCPPKGLMDLAPCIKAPMYASMPHFLDSDPELLKNV--KGLNPNVTOHG : 386
ApolSNMP1 : LCRSFKPWFQKKTYSYNGIKTNRYVANIGDFAN---DPELQCYD----TPDCLPKGIMDIRKOLKVPVMSLPHLETDTSVTNG--KGLTDFPNEHG : 386
EmorSNMP2 : ICR-----HDGCLLMGVNLNAPCQGAAPAMASLPHFYWGSDELADFSGDGKIPDKKEKH : 312
MsexSNMP2 : ICRSLYASLAGKATLFINISYIYEISSALASKSANPDNKYCKDWSASHDGLLMGVNLNAPCQGAAPASLPHFYWGSDELADFSGDGKIPDKKEKH : 397
MbraSNMP2 : ICRSLYVDLVGKKELFNISSYIYEISESALAASKSANPDNKYCKDWSASHDGLLMGVNLNAPCQGAAPASLPHFYWGSDELADFSGDGKIPDKKEKH : 396
SlitSNMP2 : ICRSYVDLVGKKELFNISSYIYEISESALAASKSANPDNKYCKDWSASHDGLLMGVNLNAPCQGAAPASLPHFYWGSDELADFSGDGKIPDKKEKH : 396

EmorSNMP1 : IEIDFEPISGTPMVAQRIQFNIQLLTKSEKMDLLKDLPGTIVPLFWIEEGLSLNKTFFVKMLKSLFIPKRVVSVVWCMI SFGSLGVAIAVIFHFKGDIM : 486
MsexSNMP1 : IQIDFEPISGTPMVAQRIQFNIQLLTKSEKMDLLKDLPGTIVPLFWIEEGLSLNKTFFVKMLKSLFIPKRVVSVVWCMI SFGSLGVAIAVIFHFKGDIM : 486
HvirSNMP1 : IEIDYEPITGTPMVAQRIQFNIQLLTKSEKMDLLKDLPGTIVPLFWIEEGLSLNKTFFVKMLKSLFIPKRVVSVVWCMI SFGSLGVAIAVIFHFKGDIM : 486
HarmSNMP1 : IEIDYEPITGTPMVAQRIQFNIQLLTKSEKMDLLKDLPGTIVPLFWIEEGLSLNKTFFVKMLKSLFIPKRVVSVVWCMI SFGSLGVAIAVIFHFKGDIM : 486
MbraSNMP1 : IEIDFEPISGTPMVAQRIQFNIQLLTKSEKMDLLKDLPGTIVPLFWIEEGLSLNKTFFVKMLKSLFIPKRVVSVVWCMI SFGSLGVAIAVIFHFKGDIM : 486
SlitSNMP1 : IEIDFEPISGTPMVAQRIQFNIQLLTKSEKMDLLKDLPGTIVPLFWIEEGLSLNKTFFVKMLKSLFIPKRVVSVVWCMI SFGSLGVAIAVIFHFKGDIM : 486
ApolSNMP1 : IIADEPELSTLMDAKORMQYNIKLLRDKIAIFKDLDSIVPCFVWHEGILNKTFVVKMLKSLFIPKRVVSVVWCMI SFGSLGVAIAVIFHFKGDIM : 486
EmorSNMP2 : TYVHLDPVTGVVIGKVRKLFQNIELRNVPVSPQLKEVPSGLFPLLWIEEGAEIPEWLRAKEMDSHTM--LWYVDAARWLVLAVAVAVLVSATLVARSAAL : 411
MsexSNMP2 : TYVYIDPVTGVVIGKVRKLFQNIELRNVPVSPQLKEVPSGLFPLLWIEEGAVMTPDQQLQELRDAHAL--LSYAQLARWIIIAAAIILAIITAVTARSATL : 496
MbraSNMP2 : SFVYIDPVTGVVIGKVRKLFQNIELRNVPVSPQLKEVPSGLFPLLWIEEGAVMTPDQQLQELRDSHKL--LGYVEVARWFLITVAITAVTARSATL : 495
SlitSNMP2 : TVVYIDPVTGVVIGKVRKLFQNIELRNVPVSPQLKEVPSGLFPLLWIEEGAVMTPDQQLQELRDSHKL--LGYVEVARWFLITVAITAVTARSATL : 495

EmorSNMP1 : HLAVAGDNSVSKIKPEN--DENKEVGMGO--NOEPAKVM-- : 522
MsexSNMP1 : RIAIKGSSVTKVNPED--GEQKDVSVIGQ--SHEPPKINM : 523
HvirSNMP1 : RLAVSGDTKVSQVTPPE--PEQKDISVIGQ--AQEPAKVNI : 523
HarmSNMP1 : RLAVSGDTKVSQVTPPE--PEQKDISVIGQ--AQEPAKVNI : 523
MbraSNMP1 : RLAVSGDTKVSQVTPPE--DPEQKDISVIGQPPAQEPAKINI : 525
SlitSNMP1 : ----- : -
ApolSNMP1 : GWAAKGESTAKVNPEDGSNEQGVSVIGQ--DREBPKVTM : 525
EmorSNMP2 : IPWPBNNSISFLLGNSVNTQEPVS----- : 436
MsexSNMP2 : ISWPBNNSVNPITIGPVSNTQVKNK----- : 519
MbraSNMP2 : LSWPBNNSVSPILGPNVTVQVKNK----- : 520
SlitSNMP2 : LSWPBNNSVSPILGPNVTVQVKNK----- : 520

```

Figure 27. Comparaison des séquences protéiques des SNMP connues de lépidoptères. Les résidus majoritaires sont indiqués en grisés. Les séquences protéiques des SNMP utilisées pour cet alignement sont reportées dans le tableau 1.

La reconstruction manuelle *in silico* de cette séquence a donc permis d'identifier la séquence presque complète (plus de quatre vingt pour cent du gène est présent) d'un nouveau gène chez le ver à soie appartenant à la sous-famille des SNMP2. La structure intron/exon de *BmSNMP2* n'a pas pu être analysée et comparée avec celle de *BmSNMP1* car cela nécessitait de disposer de la séquence complète de ce gène. Il est maintenant nécessaire de réaliser le clonage et le séquençage du gène codant pour *BmSNMP2* par des techniques de biologie moléculaire, afin de confirmer les prédictions bioinformatiques décrites ici et d'obtenir la

séquence protéique complète. La disponibilité des séquences génomiques correspondants au début et à la fin du gène *BmSNMP2* va permettre de cloner la séquence complète de celui-ci, qui pourra ensuite être utilisée pour des études d'expression tissulaire plus fines (Northern-blot, HIS) ainsi que pour des études fonctionnelles.

III.2.2. Deux sous-familles de SNMP sont présentes chez le ver à soie

Cette étude a permis d'évaluer la diversité des SNMPs chez une nouvelle espèce de lépidoptère, le ver à soie. L'identification par analyse du génome d'un seul nouveau membre potentiel, *BmSNMP2*, en plus du gène déjà connu *BmSNMP1*, confirme le répertoire limité de cette famille de gènes chez les lépidoptères. En effet, jusqu'à maintenant, seuls deux gènes semblent coder pour des SNMP, comme cela a déjà montré chez *M. sexta*, où les deux sous-familles avaient été identifiées [120]. Afin de confirmer cette situation, nous avons mené en parallèle une étude sur les SNMP des Noctuidés *M. brassicae* et *S. littoralis*, deux autres modèles étudiés au laboratoire, à laquelle j'ai participé. Nous avons identifié par clonage homologue chez les deux espèces deux gènes codant pour des SNMP appartenant aux deux sous-familles, appelés *MbraSNMP1* et *MbraSNMP2* chez *M. brassicae* et *SlitSNMP1* et *SlitSNMP2* chez *S. littoralis*. Chez le ver à soie, aucun fragment génomique codant pour un autre candidat SNMP n'a été découvert lors de nos recherches, ce qui pourrait indiquer qu'il n'y aurait que deux membres de cette famille chez cette espèce. Comme pour les PBP, on ne peut toutefois pas exclure que d'autres membres de cette famille soient présents dans le génome, s'ils possèdent par exemple des séquences très divergentes de celles des deux sous-familles de SNMP connues, empêchant leur détection par l'analyse du TBLASTN. De plus, on peut envisager la possibilité que d'autres SNMP soient présents mais sur des portions chromosomiques qui auraient échappé aux deux séquençages indépendants, même si cela paraît peu probable.

L'analyse phylogénétique des SNMP de lépidoptères confirme l'existence de deux sous-familles homologues mais très divergentes entre elles, et qui forment deux groupes séparés de façon robuste dans l'arbre phylogénétique (figure 28). Le pourcentage moyen d'identité en acides aminés entre les membres des deux sous-familles n'est en effet que de vingt pour cent, alors qu'il est de soixante-dix pour cent entre membres des SNMP1 et de soixante-cinq pour cent entre membres des SNMP2. Parmi toutes les protéines identifiées, *BmSNMP1* est la plus proche de *HvirSNMP1* (soixante treize pour cent d'identité) alors que *BmSNMP2* est la plus proche de *MsexSNMP2* (soixante six pour cent d'identité). La plus forte identité observée entre deux membres des SNMP1 est de quatre vingt dix sept pour cent entre *H. armigera* et *H. virescens*, et de quatre vingt six pour cent entre deux membres des SNMP2, *M. brassicae* et *S. littoralis*. La séquence protéique de *DmelSNMP*, qui a récemment été démontrée comme essentielle à la perception phéromonale du cis-vaccenyl acétate (cVA) chez la drosophile [126], a été incluse dans notre analyse. Cette protéine est légèrement plus proche des SNMP1 (environ trente cinq pour cent d'identité en moyenne en acides aminés) que des SNMP2 de lépidoptères (environ vingt cinq pour cent d'identité en moyenne en acides aminés), ce que l'on retrouve sur l'arbre phylogénétique.

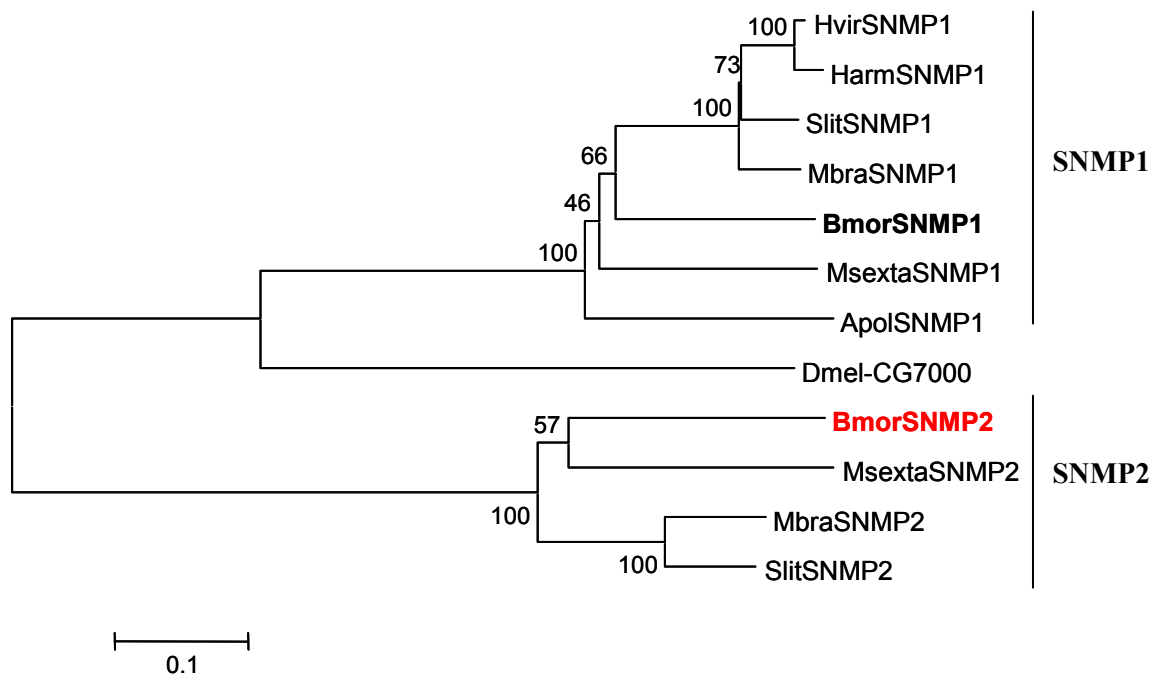


Figure 28. Analyse phylogénétique des SNMP de lépidoptères (incluant la séquence de drosophile CG7000) par la méthode du neighbor-joining. Les valeurs de bootstrap (en pourcentages) basé sur 1000 répliqués sont indiquées pour chaque nœud. Les séquences de SNMP qui ont été utilisées pour construire l'arbre sont indiquées dans le tableau 1.

III.2.3. *BmSNMP2*, la première SNMP de lépidoptère au profil d'expression ubiquitaire

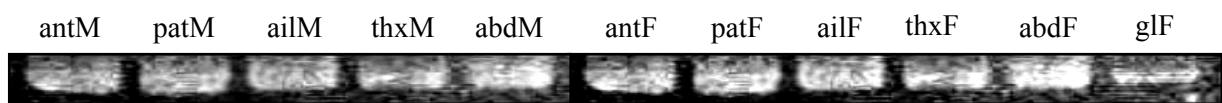
L'étude du patron d'expression de *BmSNMP2* a été réalisée par RT-PCR puis comparée aux profils obtenus chez d'autres espèces. Le patron d'expression de *BmSNMP1* a déjà été étudié par Northern-blot et montrait l'expression exclusive de ce gène dans les antennes mâles et femelles de façon équivalente, sans aucune expression dans les autres tissus non chimiosensoriels testés [120]. La même étude a également caractérisé le profil d'expression de *MsexSNMP1* et *MsexSNMP2*, avec là encore une expression exclusivement antennaire de ces deux gènes dans les deux sexes. De plus, la localisation précise de *MsexSNMP1* et 2 par hybridation *in situ* a révélé que les transcrits étaient présents au niveau des neurones de l'épithélium olfactif des antennes mâles. *BmSNMP2* a donc été testé en RT-PCR afin de vérifier son profil d'expression.

De façon très surprenante, ce gène s'avère fortement exprimé dans les antennes mais aussi dans tous les tissus non chimiosensoriels testés (figure 29, A). Cette particularité qui n'avait jamais été encore observée chez une SNMP de lépidoptère a été confirmée par des expériences complémentaires de RT-PCR consistant à diminuer le nombre de cycles d'amplification pour repérer le moment précis d'apparition du signal dans les différents tissus amplifiés. Lors de ces vérifications, le signal *BmSNMP2* est apparu en même temps (après le même nombre de cycles d'amplification) dans les antennes et dans les autres tissus (non montré), indiquant clairement des niveaux d'expression comparables de ce gène dans tous les tissus testés.

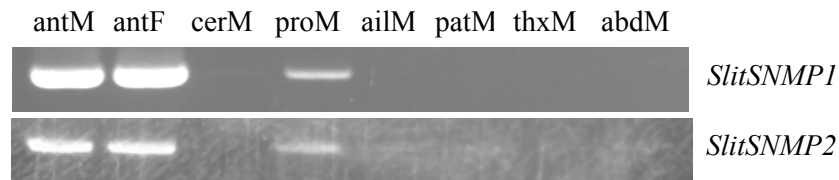
Afin de vérifier si cette situation inédite pouvait être observée chez d'autres SNMP appartenant à d'autres espèces, les données provenant des deux espèces modèles du

laboratoire ont été analysées et incluses pour comparaison. La caractérisation des patrons d'expression des SNMP a donc été réalisée chez les deux espèces de la famille des Noctuidés, *M. brassicae* et *S. littoralis* (Jacquin-Joly, pers. com.). De façon intéressante, chez *S. littoralis*, *SlitSNMP 1* et *2* semblent exprimés uniquement dans les organes chimiosensoriels (antennes et proboscis) comme observé chez *M. sexta* (figure 29, B), alors que la situation chez *M. brassicae* se rapproche de celle observée chez *B. mori*. En effet, *MbraSNMP1* est exprimé de façon exclusivement antennaire tandis que *MbraSNMP2* est exprimé dans tous les tissus testés (figure 29, C). Cette expression différentielle entre *SNMP1* (antennaires) et *SNMP2* (ubiquistes) chez *B. mori* et *M. brassicae* est en net contraste avec la situation observée chez *M. sexta* et *S. littoralis* où l'expression de ces deux catégories de gènes est uniquement détectée dans les tissus chimiosensoriels.

A. *BmSNMP2*



B. *S. littoralis*



C. *M. brassicae*

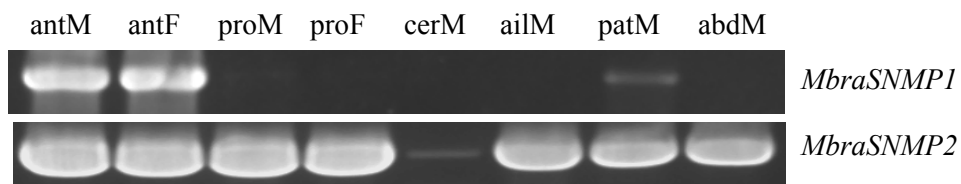


Figure 29. Etude de l'expression tissulaire en RT-PCR de *BmSNMP2* (A.), *SlitSNMP1* et *2* (B.) et *MbraSNMP1* et *2* (C.) dans différents tissus chez ces trois espèces : antennes (ant), pattes (pat), ailes (ail), thorax (thx), abdomens (abd), glande à phéromone (gl), proboscis (pro) et cerveaux (cer). M, mâles ; F, femelles. La qualité des ADNc a été contrôlée par amplification du gène ribosomal ubiquitaire *BmRpL8*.

III.2.4. Rôles potentiels de *BmSNMP1* et *BmSNMP2*

Chez les lépidoptères, l'implication des récepteurs de la famille des SNMP dans la perception olfactive est très fortement suggérée [118]. En effet, il a été montré jusqu'ici que ces protéines étaient antenne-spécifiques, et localisées exclusivement dans les membranes des NRO au moment de la différenciation fonctionnelle des antennes. Si un rôle de récepteur au sens strict des molécules odorantes n'a pas encore été clairement rejeté, les différences de structure avec les RCPG rendent cette possibilité vraiment improbable. L'homologie des SNMP de lépidoptères avec les récepteurs CD36 de vertébrés, qui sont capables d'interagir avec des ligands protéine/lipide, a conduit à l'élaboration de plusieurs hypothèses fonctionnelles pour les membres de cette famille. Parmi ces hypothèses, celle d'une interaction avec les ligands hydrophobes ou avec les complexes OBP/ligand semble la plus

vraisemblable. La démonstration récente de l'implication d'une SNMP de drosophile dans la réponse électrophysiologique d'un RP a permis d'étayer cette hypothèse [126]. En effet, selon cette étude, *DmelSNMP* agirait à la manière d'un co-facteur pour le RP, en permettant la reconnaissance du ligand lipidique (cVA) ainsi que l'activation du RP correspondant. Comme cela a été montré ici par une analyse phylogénétique, *DmelSNMP* est (légèrement) plus proche des SNMP1 que des SNMP2 de lépidoptères. Par conséquent, on pourrait imaginer que la sous-famille SNMP1 de lépidoptère puisse également tenir un rôle dans la perception de la phéromone, alors que la sous-famille SNMP2 pourrait être impliquée dans la perception d'autres molécules odorantes ou non.

Néanmoins, cette hypothèse sur la sous-famille SNMP1 est remise en question par leur expression systématique dans les antennes femelles de lépidoptères. Ainsi, chez le ver à soie, *BmSNMP1* est exprimée fortement et de façon équivalente dans les antennes des deux sexes [120]. Cette forte expression dans les antennes femelles semble donc pour l'instant incompatible avec un rôle unique des SNMP1 dans la réception de la phéromone, mais ces protéines pourraient également assurer une autre fonction dans les antennes femelles. De plus, il faut noter que *DmelSNMP* n'est pas exprimé exclusivement dans les NRO antennaires, mais aussi dans des cellules de soutien non-neuronales, sur le proboscis, et dans d'autres parties du corps encore indéterminées [126], ce qui indique que cette protéine pourrait être impliquée dans d'autres processus biologiques que la réception phéromonale. Une étude précise de la localisation de *BmSNMP1* dans les NRO des différents types sensillaires chez les deux sexes permettrait de vérifier rapidement cette hypothèse d'une implication dans la perception phéromonale uniquement.

En ce qui concerne la sous-famille des SNMP2, les profils d'expression ubiquitaires observés chez *B. mori* et *M. brassicae* lors de cette étude sont opposés à la situation décrite chez *M. sexta* et *S. littoralis*. Cette situation inattendue d'une expression hétérogène d'un gène homologue chez différentes espèces rend très difficile l'élaboration d'hypothèses fonctionnelles. Néanmoins, la distribution de *MsexSNMP2* dans les NRO des antennes des deux sexes est un indice très fort de l'implication de cette famille dans la réception odorante et/ou phéromonale. De plus, *DmelSNMP* serait également localisée dans des organes non-chimiosensoriels, appuyant l'hypothèse d'un rôle olfactif possible de *BmSNMP2* dans les antennes. On pourrait imaginer que les membres de cette sous-famille SNMP2 puissent, selon l'organe d'expression, remplir une fonction olfactive ou non, comme par exemple le transport ou la réception de petites molécules lipidiques ou de glycoprotéines, de façon analogue à certains récepteurs CD36 de vertébrés. Selon cette hypothèse, le profil de spécificité des SNMP2 serait donc probablement plus large que celui des SNMP1, ce qui reste à démontrer. L'étude de la localisation précise de *BmSNMP2* dans les antennes mais aussi dans les autres tissus, permettrait de vérifier rapidement la pertinence de cette hypothèse.

L'utilisation de la technique de RT-PCR sur sensilles trichoïdes longues, développée au laboratoire, pourrait par exemple être utilisée afin de vérifier si les deux SNMP identifiées chez *B. mori* sont présentes dans ces sensilles.

III.3. Conclusion et perspectives

Ce travail préliminaire réalisé sur cette famille de gènes chez le ver à soie a permis l'identification d'un nouveau gène appartenant à la sous-famille des SNMP2 de lépidoptères, appelé *BmSNMP2*. Ce gène, qui est exprimé de façon générale dans tous les tissus et pas uniquement dans les antennes est, à l'heure actuelle, avec *MbraSNMP2*, le seul cas d'expression ubiquitaire d'une SNMP recensé chez un lépidoptère. Si un rôle de ces SNMP particuliers dans la perception des molécules odorantes et/ou des phéromones n'est pas à exclure, leur expression dans des tissus non chimiosensoriels laisse penser qu'ils pourraient aussi être impliqués dans des mécanismes plus généraux comme la réception ou le transport de molécules lipidiques non odorantes.

Ainsi, il existerait deux sous-familles de SNMP chez les lépidoptères, révélant une certaine diversité de cette famille de récepteurs, modérée par rapport à la situation observée chez la drosophile. De plus, chez *A. polyphemus*, une analyse fine a permis de montrer que *ApolSNMP1* serait exprimé de façon différentielle en fonction des types sensillaires [152]. Ainsi, comme les OBP ou les RO, les SNMP de lépidoptères pourraient contribuer à définir le profil de réponse olfactive des NRO dans les sensilles. L'analyse des profils d'expression différentielle des SNMP chez d'autres espèces permettrait d'étayer cette hypothèse.

La fonction précise des SNMP1 et 2 dans les processus de réception olfactive et/ou phéromonale n'est pas encore déterminée chez les lépidoptères. Néanmoins, les SNMP pourraient être impliqués dans l'activation des RP (*DmelSNMP* est en effet nécessaire pour la réponse électrophysiologique des NRO exprimant OR67d), ou bien dans l'étape de terminaison du signal, en séquestrant les ligands après leur transport par les OBP ou leur interaction avec les RO. Seules des études fonctionnelles menées sur ces deux sous-familles de protéines devraient permettre de décrypter leur rôle précis dans la réception olfactive périphérique chez les lépidoptères.

Il est donc maintenant nécessaire de réaliser l'analyse fonctionnelle des deux sous-familles SNMP1 et 2 de lépidoptères, car rien ne prouve actuellement de façon claire que ces gènes soient réellement impliqués dans la réception des odeurs ou des phéromones. Le ver à soie est un modèle qui posséderait d'ailleurs toutes les qualités pour effectuer cette étude, *BmSNMP1* et 2 sont maintenant connus, de nombreux outils moléculaires sont disponibles et la réponse à la phéromone est parfaitement bien caractérisée.

Afin de vérifier si *BmSNMP1* et 2 pourraient être impliquées dans la perception odorante ou phéromonale, l'utilisation de l'ARN interférence en injections ou couplé avec la transgénèse pourrait permettre d'inhiber spécifiquement chaque gène *in vivo* et ensuite de vérifier, par des enregistrements EAG et des études de comportement, si la perception olfactive à la phéromone ou à d'autres odorants serait modifiée par ces inhibitions. Parallèlement, des études d'hybridation *in situ* en double marquage, avec *BmPBP1* par exemple, permettraient d'étudier la localisation précise de ces deux sous-familles de SNMP dans les différents types sensillaires, ce qui pourrait nous renseigner sur le type de réponse, phéromonale ou non, dans laquelle elles pourraient être impliquées.

Savoir si ces récepteurs sont capables de reconnaître les ligands odorants seuls, les complexes OBP/ligand, ou les complexes RO/ligand (ou autres), et surtout, découvrir comment ils interagissent avec eux, promet encore de nouvelles avancées passionnantes dans le domaine de la communication chimique, et peut être même une modification importante du schéma général de la réception périphérique olfactive et/ou phéromonale chez les insectes.

Récemment, lors d'un congrès, R. Vogt (University of South Carolina, USA), l'un des pionniers de la recherche sur l'olfaction des insectes, a annoncé le début d'une collaboration entre son équipe et celle K. Touhara (University of Tokyo, Japan), dans le but de caractériser fonctionnellement cette famille de récepteurs chez le ver à soie. Ils ont par exemple déjà prévu de réaliser l'expression combinée de BmOR1 et BmSNMP1 en oocytes de xénopes, et de regarder l'effet de cette co-expression sur la réponse des oocytes à la phéromone. Ces équipes ne semblent toutefois pas disposer de la séquence de *BmSNMP2* pour leurs analyses fonctionnelles.

Ce travail sur la famille des SNMP chez le ver à soie est inclus avec les résultats obtenus chez *S. littoralis* et *M. brassicae* dans une publication actuellement en préparation dans laquelle je serai co-auteur.

Chapitre IV. Deux AOX antennaires potentiellement impliquées dans la dégradation de la phéromone

IV.1. Introduction et contexte

A l'heure actuelle, très peu d'ODE ont été caractérisées au niveau moléculaire, et cinq d'entre elles l'ont été au laboratoire. J'ai notamment pu participer lors de mon arrivée dans l'équipe à la caractérisation de la première séquence d'un gène codant pour une AOX antennaire chez *M. brassicae* [140], dont la séquence partielle a permis l'identification des AOX décrites ici, ainsi qu'à la caractérisation moléculaire de deux nouvelles estérases exprimées dans les tissus chimiosensoriels chez les noctuelles *S. littoralis* et *S. nonagrioides* [138]. L'étude des enzymes impliquées dans les processus de dégradation antennaire des composés odorants est pourtant primordiale pour mieux comprendre leur implication réelle dans l'étape de terminaison du signal, cruciale dans la dynamique de la réponse neuronale et par conséquent dans la perception olfactive toute entière. Nous nous sommes donc investis, sur le modèle *B. mori*, dans la recherche de gènes codant potentiellement pour des enzymes pouvant être classées parmi les PDE, en profitant de l'accès aux séquences génomiques disponibles.

Comme on l'a vu dans l'introduction bibliographique, chez le ver à soie, des activités enzymatiques de type alcool oxidase/déshydrogénase et aldéhyde oxidase (AOX) ont été identifiées de longue date dans les antennes mâles [133] [132]. Néanmoins, aucune donnée moléculaire n'était encore disponible chez cette espèce sur des enzymes antennaires appartenant à ces différentes familles et potentiellement impliqués dans la dégradation des deux composés phéromonaux à fonction alcool (Bol) et aldéhyde (Bal). La disponibilité des séquences génomiques chez cette espèce nous a alors fourni le matériel nécessaire pour pouvoir enfin identifier et étudier ces enzymes au niveau moléculaire. De fait, et malgré leur potentiel, assez peu d'études s'intéressent à l'implication des enzymes dans la dégradation des composés phéromonaux chez les insectes et ce fut un réel plaisir pour moi de contribuer à décrypter un petit peu plus ces acteurs primordiaux mais injustement ignorés.

Par analogie avec ce qui est connu chez les vertébrés et d'autres espèces d'insectes, les enzymes correspondantes pourraient appartenir à différentes familles de gènes. Ainsi, chez les insectes, les alcool déshydrogénases peuvent soit appartenir à la famille des short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) [178], soit à la famille des long-chain dehydrogenase (ADH) [179] [180]. Ces enzymes sont par ailleurs très diversifiées en terme de séquence primaire, tandis qu'une seule famille moléculaire relativement homogène d'AOX, celle des molybdoflavo-enzymes, est connue chez les animaux [181].

Nous avons donc focalisé nos recherches sur les gènes codant pour des PDE potentiellement impliquées dans la dégradation des deux composés phéromonaux à fonction alcool, le Bol, et à fonction aldéhyde, le Bal, par des méthodes bioinformatiques, en utilisant des séquences connues de gènes codant pour des classes enzymatiques potentiellement capables de dégrader ce type de molécule chez d'autres espèces d'insectes, dont la drosophile et des lépidoptères. Les résultats préliminaires ont révélé la présence dans le génome de *B.*

mori d'un grand nombre de gènes candidats. Parmi ceux-ci, deux gènes codant pour des ADH, trois pour des SDR et six pour des AOX ont été retenus sur des critères d'identité de séquence pour une étude préliminaire de leur patron d'expression. En ce qui concerne les cinq premiers, les résultats de RT-PCR montraient qu'aucun de ces gènes n'était spécifiquement exprimé dans les antennes, alors que deux gènes codant pour deux AOX présentaient une expression antenne spécifique prometteuse. La caractérisation des gènes appartenant aux deux classes enzymatiques capables de dégrader le Bol s'avérant trop aléatoire, et au vu du temps imparti à cette partie de mon travail sur les enzymes, j'ai choisi de concentrer mes efforts sur les deux gènes appartenant à la classe enzymatique capable de dégrader le Bal, les AOX. De plus, des données biochimiques précises étaient déjà disponibles chez *B. mori* sur ces enzymes antennaires [132], constituant autant d'indices pour nos recherches. D'autre-part, comme on l'a vu en introduction bibliographique, le Bal étant un intermédiaire du catabolisme du Bol [133], une enzyme capable de dégrader le Bal peut-être aussi indirectement impliquée dans la dégradation du Bol.

Les résultats obtenus sur ces deux gènes appelés *BmAox1* et *BmAox2*, sont décrits de façon plus détaillée dans l'article joint, publié en 2007 [155].

IV.2. Conclusion et perspectives

Après analyse bioinformatique, six gènes candidats, appelés *BmAOX1* à *6* ont été identifiés dans le génome du ver à soie, et leur patron d'expression tissulaire étudié par RT-PCR afin de sélectionner les candidats olfactifs les plus pertinents. Parmi ces gènes codant pour des AOX potentielles, deux ont été caractérisés de façon plus complète de par leur localisation antennaire. *BmAOX1* et *2* sont en effet exprimées de façon sélective dans les antennes des deux sexes, et enrichies chez les mâles, tandis que trois autres (*BmAOX3*, *4* et *5*) présentent une expression ubiquitaire et peu intense dans les antennes, et le dernier (*BmAOX6*) ne semble pas exprimé chez les adultes (ou alors correspondrait à un pseudogène). *BmAOX1* est également très faiblement exprimé dans les glandes à phéromone femelles, où il pourrait intervenir dans la régulation de la concentration en Bal dans le mélange émis par la femelle. En hybridation *in situ*, *BmAOX1* et *2* sont localisés du côté sensillaire, à la base des sensilles olfactives, confirmant un rôle potentiel dans la réception olfactive, mais après RT-PCR sur ADNc de sensilles longues, technique développée au laboratoire par mes soins, seul *BmAOX2* s'avère finalement exprimé dans les sensilles trichoïdes longues des mâles.

BmAOX2 est donc antenne-spécifique et sur-exprimé chez les mâles. De plus son association avec les sensilles sensibles à la phéromone laisse penser que l'enzyme correspondante, BmAOX2, pourrait être une PDE impliquée dans la dégradation du Bal, et aussi, comme on l'a vu, peut être indirectement dans celle du Bol. Ainsi, cette protéine pourrait correspondre à l'AOX antennaire caractérisée précédemment au niveau biochimique et qui était elle aussi enrichie dans les antennes mâles mais qui a surtout été démontrée comme capable de dégrader le Bal [132]. *BmAOX1*, qui est probablement exprimé dans un autre type de sensilles que les sensilles longues, pourrait coder pour une enzyme capable de dégrader des composés aldéhydes variés, incluant le Bal. Pour le moment, et même si les données apportées par cette étude semblent appuyer, l'implication réelle des ces deux enzymes dans les processus de réception olfactive et/ou phéromonale ainsi que dans l'étape de terminaison du signal reste encore une hypothèse.

De même, il n'est pas impossible que les trois autres AOX exprimées de façon plus large mais présentes faiblement dans les antennes soient également capables de dégrader le Bal, mais avec probablement moins d'efficacité que BmAOX2. Ces trois AOX pourraient par exemple, avec BmAOX1, participer à la dégradation des composés à fonction aldéhyde émis par des plantes, car ceux-ci sont très répandus dans le règne végétal. Cette diversité d'AOX dans les antennes des deux sexes pourrait ainsi dégrader une variété d'odorants à fonction aldéhyde, par des activités différentielles et/ou des localisations sensillaires adaptées.

Pour aller plus loin, il serait nécessaire de réaliser une analyse fonctionnelle de ces deux enzymes antennaires, en particulier de BmAOX2 qui, par sa localisation dans les sensilles longues sensibles à la phéromone, représente le candidat le plus intéressant. La production par des cultures cellulaires de protéines recombinantes, couplée à des tests biochimiques de dégradation enzymatique de la phéromone *in vitro* pourrait permettre de prouver l'implication de cette enzyme (ou non) dans la dégradation du composé phéromonal Bal. L'étude de la cinétique de dégradation du Bal par cette enzyme nous renseignerait également sur la vitesse à laquelle cette enzyme est capable de cataboliser ce substrat et par

conséquent, sur son implication possible dans l'étape de terminaison du signal. BmAox2 a peut-être subi au cours de l'évolution une spécialisation dans la dégradation antennaire très rapide du Bal, et cela pourrait être vérifié par des études de cinétique. L'une des deux autres AOX antennaires, identifiée chez *M. sexta* (espèce qui utilise également le Bal comme composé phéromonal), MsexAOX, a été estimée pouvoir dégrader *in vivo* la moitié des molécules de Bal en 0,6ms, ce qui est extrêmement rapide et compatible avec un rôle dans la terminaison du signal. Mais ces données n'ont été obtenues que grâce à des systèmes *in vitro*, avec une AOX partiellement purifiée [131]. Le problème majeur repose néanmoins sur la taille de ces protéines, très volumineuses, ce qui rend leur expression en système hétérologue délicate, d'autant plus qu'elles sont connues pour s'organiser en dimères, comme cela a été démontré pour cette même AOX de *M. sexta* [131].

Afin de remédier à ce problème, une autre approche peut-être envisagée : l'utilisation de l'ARN interférence en injections ou couplée avec la transgénèse permettrait d'inhiber spécifiquement BmAox2 *in vivo* et ensuite de vérifier par des enregistrements en EAG si le profil de réponse électrophysiologique du NRO au Bal serait modifié par cette inhibition. Le profil de réponse typique de ce NRO au Bal après stimulation est caractérisé par une dépolarisation suivie d'une repolarisation rapide [34]. Si BmAox2 est impliqué, par une dégradation enzymatique très rapide du Bal, dans la terminaison rapide du signal, alors la phase de repolarisation pourrait durer beaucoup plus longtemps chez les individus ayant subi l'inactivation de BmAox2, car des molécules de Bal non dégradées pourraient, dans ce cas, continuer à stimuler les récepteurs.

Cette hypothèse sur le phénotype invalidé repose sur un travail récent effectué chez la drosophile. En effet, de façon totalement inattendue, une étude [73] a montré que la sensille ab4 de drosophile répondait aux composés phéromonaux Bol et Bal de manière dose dépendante et surtout avec la même efficacité que la sensille trichoïde longue chez *B. mori*. Les auteurs de cette étude ont exprimé le récepteur au Bol, BmOR1 dans le système « empty neurone » de la sensille ab3 qu'ils ont ensuite stimulée par la phéromone en présence (ou non) de BmPBP1. Les enregistrements électrophysiologiques des sensilles ab4 et ab3-BmOR1 stimulées par le Bol ont révélé que la sensille ab4 répondait de manière similaire à la sensille trichoïde chez *B. mori*. Cela suggère que tous les composants nécessaires pour la terminaison du signal sont bien présents dans cette sensille ab4, tandis que les réponses au Bol de la sensille ab3-BmOR1 montraient une phase de repolarisation beaucoup plus lente, indiquant qu'il manquait probablement un (des) acteur(s) moléculaire(s) indispensable(s) à cette étape cruciale. La sensille ab3 exprimant bien BmOR1 et étant stimulée par un mélange Bol-BmPBP1, on peut penser que ce ne soit ni le récepteur, ni la PBP qui soient impliqués dans ce phénomène, mais plutôt une ODE absente de cette sensille, et qui serait capable de dégrader efficacement le Bol. Les expériences futures de RNAi devraient permettre de vérifier si cette hypothèse est la bonne concernant BmAox2.

Article de publication, Gene 2007

Identification of candidate aldehyde oxidases from the silkworm *Bombyx mori* potentially involved in antennal pheromone degradation

Julien Pelletier, Françoise Bozzolan, Marthe Solvar, Marie-Christine François, Emmanuelle Jacquin-Joly, Martine Maibèche-Coisne

(2007)

Gene
404 (1-2) : 31-40



Identification of candidate aldehyde oxidases from the silkworm *Bombyx mori* potentially involved in antennal pheromone degradation

Julien Pelletier^{a,b}, Françoise Bozzolan^a, Marthe Solvar^a, Marie-Christine François^b,
Emmanuelle Jacquin-Joly^b, Martine Maïbèche-Coisne^{a,b,*}

^a UMR-A 1272 « Physiologie de l'Insecte: Signalisation et Communication », Université Pierre et Marie Curie-Paris6, 7 Quai St-Bernard, F-75005 Paris, France

^b UMR-A 1272 « Physiologie de l'Insecte: Signalisation et Communication », Centre INRA de Versailles, Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles cedex, France

Received 6 August 2007; received in revised form 21 August 2007; accepted 21 August 2007

Available online 12 September 2007

Received by S. Yokoyama

Abstract

Signal inactivation is a crucial step in the dynamic of olfactory process and involves various Odorant-Degrading Enzymes. In the silkworm *Bombyx mori*, one of the best models for studying olfaction in insects, the involvement of an antennal-specific aldehyde oxidase in the degradation of the sex pheromone component bombykal has been demonstrated over the three past decades by biochemical studies. However, the corresponding enzyme has never been characterized at the molecular level. Bioinformatic screening of *B. mori* genome and molecular approaches have been used to isolate several candidate sequences of aldehyde oxidases. Two interesting antennal-expressed genes have been further characterized and their putative functions are discussed in regard to their respective expression pattern and to our knowledge on aldehyde oxidase properties. Interestingly, one gene appeared as specifically expressed in the antennae of *B. mori* and associated in males with the bombykal-sensitive sensilla, strongly suggesting that it could encode for the previously biochemically characterized enzyme.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Odorant-degrading enzyme; Molybdo-flavoenzyme; Olfaction; Bombykal

1. Introduction

Olfaction in insects plays an important role in various behaviours linked with reproduction or nutrition. Recognition of volatile chemical signals takes place on the antennae in olfactory sensilla. These sensory hairs present an aqueous lumen, surrounding the dendrites of the olfactory receptor neurons (ORNs) and containing Odorant-Binding Proteins (OBPs) as well as extracellular Odorant-Degrading Enzymes (ODEs). Hydrophobic odorant molecules entering the sensilla supposedly interact with OBPs, which transport them to the dendritic olfactory receptors (ORs) (review in Vogt, 2005). The last step of the olfactory process is the signal termination, which

is critical as it allows controlling the odour half-life in the perireceptor space that interferes with the sensitivity of ORNs and length of neuronal response. This inactivation step is particularly important in odorant-mediated behaviours in moths, well exemplified in sex pheromonal communication. Indeed, while flying to a pheromone source, male moths encounter small pockets of pheromone molecules separated by clean air spaces. To follow this trail, males have to reset their sensory system on a millisecond timescale in order to obtain a spatial and temporal resolution of the sex pheromone plume (Vickers, 2006). Several hypotheses have been proposed for odorant inactivation, such as odour sequestration by OBPs, internalization by ORs and enzymatic degradation in inactive or poorly active form by ODEs. Despite their potential important function in the dynamic of signal recognition, and in contrast to the great number of OBPs and ORs known to date in insects, only a few insect ODE genes have been identified and functionally characterized (review in Vogt, 2005), although early studies in

Abbreviations: AOX, aldehyde oxidase; MFE, molybdo-flavoenzyme; BAL, bombykal; XDH, xanthine dehydrogenase.

* Corresponding author. UMR-A 1272, INRA de Versailles, Bât. 1, Route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles cedex, France. Fax: +33 1 30833119.

E-mail address: maibeche@versailles.inra.fr (M. Maïbèche-Coisne).

moths revealed various enzymatic activities toward pheromone molecules in the sensillum lymph (Vogt and Riddiford, 1981; Kasang et al., 1988).

The silkworm *Bombyx mori* is one of the most studied models for insect olfactory research and males of this species possess a legendary sensitivity and selectivity for the female sex pheromone. This sex pheromone was the first identified in the animal kingdom and consists of a mixture of two compounds emitted by females: the attractant bombykol (*E*-10, *Z*-12-hexadecadien-1-ol or BOL) and the corresponding aldehyde bombykal (*E*-10, *Z*-12-hexadecadien-1-al or BAL) (Butenandt et al., 1959; Kaissling et al., 1978). Each component stimulates in male its own specialized and highly sensitive ORN and both types of ORNs are housed in the same type of olfactory hairs called the long sensilla trichodea. In addition to the already known Pheromone-Binding Protein PBP1 (Krieger et al., 1991), the genome sequence of *B. mori* was achieved recently (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004), allowing the identification of two new PBPs (Forstner et al., 2006) as well as numerous ORs genes (Wanner et al., 2007), including the pheromone receptors (Sakurai et al., 2004). However, specific enzymes involved in BOL and BAL catabolism have not been yet identified at the molecular level, despite biochemical evidence of enzymatic degradation of these pheromone components by antennal extracts. Indeed, antennal alcohol-oxidizing activities (Kasang et al., 1989) and aldehyde oxidase activities (Rybczynski et al., 1990) are known to co-occur, leading to efficient degradation of these two components. Enzymatic conversion of BOL in the silkworm antennae revealed that it was oxidized to long-chain fatty acids. Fatty aldehydes, including BAL, were found in trace amounts after BOL oxidation, suggesting that they are produced as intermediate metabolites (Kasang et al., 1989). If the corresponding alcohol oxidase was never characterized, more biochemical data are available on the enzyme involved in BAL antennal catabolism. Its degradation was indeed extensively studied in three moth species, *B. mori*, the wild silkworm *Antheraea polyphemus*, and the tobacco hornworm *Manduca sexta* (Rybczynski et al., 1989, 1990), which all possess BAL in their sex pheromone blend. In these species, BAL is efficiently oxidized in the corresponding carboxylic acid by antennal extracts, suggesting the presence of either an aldehyde dehydrogenase or an aldehyde oxidase (AOX) in the sensilla. As BAL oxidation didn't require NAD(P)⁺ and generated reduced O₂, the antennal enzyme involved was demonstrated to be undoubtedly an aldehyde oxidase. Electrophoresis analysis also revealed that the AOX from *B. mori* was selectively expressed in the antennae of both sexes but over expressed in males and consisted of a dimer, with a monomeric form of 130 kDa (Rybczynski et al., 1990). These biochemical properties indicated that the corresponding enzyme belongs to the molybdo-flavoenzyme (MFE) family (Garattini et al., 2003). Indeed, AOXs from the MFE family consist in homodimers of identical subunits of approx. 150 kDa and are pure oxidases, able to degrade a wide variety of aldehydes without binding of NAD⁺.

In the cabbage armyworm *Mamestra brassicae*, which also use an aldehyde as minor pheromone component, we have isolated a partial cDNA encoding an aldehyde oxidase polypeptide belonging to the MFE family and selectively

expressed in the chemosensory organs of this moth, including antennae (Merlin et al., 2005). Interestingly, expression of the corresponding transcripts in the antennae was restricted to the olfactory sensilla. We used this partial sequence to search for putative AOX expressing genes in the genome from *B. mori* by a bioinformatic approach. Several putative AOX fragments were identified and their expression patterns were then studied in order to select the olfactory specific ones. Interestingly, two candidates named *BmAOX1* and *BmAOX2* appeared as strongly expressed in the antennae. The two full-length corresponding Open Reading Frames (ORFs) were isolated by PCR-strategy and the intron/exon structure of the corresponding genes was analyzed. Moreover, *BmAOX2* appeared to be selectively expressed in the antennae and associated with the long olfactory sensilla, strongly suggesting that it could encode for the previously biochemically characterized AOX involved in BAL degradation.

2. Materials and methods

2.1. Insects and tissue preparation

B. mori cocoons (Nistari strain) were supplied by the Unité Nationale Séricicole (INRA, Lyon, France) and maintained at 22±2 °C. Antennae, legs, wings, thorax, abdomens and pheromone glands from males and females were dissected three days after emergence and stored at -80 °C until use. To study the AOX expression during development, heads from larvae (1st to 5th instar), pupal male antennae (5 to 1 day before eclosion) and adult male antennae (newly eclosed to 3-day-old) were collected. Long sensilla trichodea from 3-day-old male antennae were collected individually according to the following procedure adapted from (Vogt et al., 1989): antennae were inserted into an eppendorf tube containing small glass beads, frozen in liquid nitrogen and vigorously shaken for 1 min. Beads were removed and sterile water was added, then the solution containing minute fragments of antennae was put on a microscope slide in order to selectively collect by capillarity the long sensilla trichodea using microelectrodes. For *in situ* hybridization, antennae were fixed in 4% paraformaldehyde overnight at 4 °C, rinsed in PBS (0.85% NaCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7.1; Sigma), cryoprotected in PBS-sucrose at 4 °C and then stored in methanol at -20 °C until use.

2.2. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNAs from the different tissues were extracted with TRIzol[®] reagent (Invitrogen) and treated with DNaseI (Promega). Single stranded cDNAs were synthesized from total RNAs (5 µg) with M-MLV reverse transcriptase (Clontech) using buffer and protocol supplied in the Advantage[™] RT-for-PCR Kit (Clontech). For 5' and 3' RACE-PCR, antennal cDNAs were synthesized from 2 µg of male antennal total RNAs at 42 °C for 1.5 h using the SMART[™] RACE cDNA Amplification kit (Clontech) with Superscript II reverse transcriptase (Gibco BRL), 5' or 3'-CDS primer and SMART II oligonucleotide.

2.3. Bioinformatics and sequence analysis

The unique lepidopteran AOX sequence available, *i.e.* the partial one from *M. brassicae* (Merlin et al., 2005) was used to search for similar sequences in the silkworm genome by performing TBLASTN (Altschul et al., 1990) searches of assembled scaffolds available through two Internet websites: <http://kaikoblast.dna.affrc.go.jp/> (Silkworm Genome Research Program, National Institute of Agrobiological Sciences, Japan) and <http://silkworm.genomics.org.cn/> (Beijing Genomics Institute, China). Amino-acid deduced sequences of interest were analysed with MWCALC (Infobiogen) and sequence alignment was performed with CLUSTALW (NPS@IBCP). AOX related sequence alignment was used to create an entry file for phylogenetic analysis. An unrooted neighbor joining tree was calculated using the MEGA 3.1 program (Kumar et al., 2004) at default settings. Branch support was assessed by bootstrap analysis based on 1000 replications.

2.4. Expression profiles of the putative AOXs from *B. mori* by RT-PCR

Genome analysis led to the identification of several fragments that encoded six partial potential AOXs (Table 1). Specific sense (s) and antisense (as) primers to these putative exons were used to amplify the corresponding regions from male and female cDNAs from various tissues, in order to select the antennal-specific AOX sequences. Primers pairs were chosen in the less conserved regions of the six sequences in order to avoid cross amplification and were as follows: BmAOX1s 5'-GTCTCAAGATAATAATCCTCTACCA-

GAGATG-3', BmAOX1as 5'-CCGGAAAAAATTCTCAGTCTGCT-3'; BmAOX2s 5'-ATGCAAGTCACAAATCCTATTCCAC-3', BmAOX2as 5'-CCTCCTGAAATATATTCGGAAATCTG-3'; BmAOX3s 5'-GGTTCAGAGCACCTGGCACACTAG-3', BmAOX3as 5'-CGCGCTTGTGGAACATAGTAAGTC-3'; BmAOX4s 5'-CGACTGTCGCTACGAACCCCTAAC-3', BmAOX4as 5'-GATTGGGTTGTAAGAGTTCCTCCTG-3'; BmAOX5s 5'-GCGGTTAAAAAAGATGCAATCTCAG-3', BmAOX5as 5'-CGATCGGTATGCTCTGGCAGAG-3'; BmAOX6s 5'-GACGTCAGCCCAGTGACGTCAC-3', BmAOX6as 5'-GTAGCCGTCTCTCGATTGCCAC-3'. PCRs were performed with 35 cycles of amplification and annealing temperatures between 55 °C and 59 °C. To study the expression profiles of *BmAOX1* and *BmAOX2* during development, specific sense (BmAOX1s, BmAOX2s) and antisense primers (BmAOX1as, BmAOX2as) were used with 30 cycles of amplification and annealing temperature of 56 °C. PCR on cDNA from male long sensilla trichodea were performed using the same primers with 40 cycles. *BmRpl8*, encoding a ribosomal protein (accession number AY769276), was used as control and was amplified with 35 cycles and annealing temperature of 52 °C using specific primers (BmRpl8s: 5'-CCAGCAGTTACGTTTGACCTTGTA-3'; BmRpl8as: 5'-GAGTCATCCGAGCTCAAAGGAAGG-3').

2.5. Molecular cloning of the two antennal AOX sequences, *BmAOX1* and *BmAOX2*

As only partial sequences were retrieved from genome analysis, the complete sequences of two antennal-expressed AOXs, named *BmAOX1* and *BmAOX2*, were obtained as follows: male antennal cDNAs were first used to generate by PCR fragments corresponding respectively to the sequence of Bmb019083 (*BmAOX1*) and Bmb019080 (*BmAOX2*) located on the BGI scaffold 005125, using specific primer pairs designated according to the exon's sequences (AOX1s: 5'-AACGCTCATGCAGT-TGTTAACGCT-3', AOX1as: 5'-GCAGACTTGGGCGGCCT-TAGT-3', AOX2s: 5'-GAAGTGGCAGGCAAGTTTGGT-3', AOX2as: 5'-TGACTGGAATTCCTTGTGCAAGTG-3'). After 35 amplification cycles performed with an annealing temperature of 54 °C, the two fragments of 1827 bp and 1065 bp were cloned into pCR[®] II-TOPO[®] plasmid (Invitrogen) and sequenced (Biofidal, France). The 5' and 3' sequences of both cDNAs were then obtained by 3' and 5'RACE-PCR, using specific primers designated according to the partial cDNA sequences cloned as described above (3RAOX1: 5'-ACGCCGCAGACGGCTCAGGGGCA-3', 3RAOX1: 5'-CACGGTGATG-GAACTGTCGTGATCACCCAC-3'; 5RAOX2: 5'-CCTCAGTGCATTGAGTCTGAGTGCTTTATCCCC-3', 3RAOX2: 5'-TGCACTGAGGAACAAAGAAATGTGTG-CAGCG-3'). Touchdown PCR was performed as follows: after 5 min at 94 °C, 5 cycles of 30 s at 94 °C and 3 min at 72 °C, 5 cycles of 30 s at 94 °C and 70 °C and 3 min at 72 °C, 30 cycles of 30 s at 94 °C and 68 °C and 3 min at 72 °C, with a final elongation step of 5 min at 72 °C. The amplified fragments were cloned and sequenced as described previously. By merging the overlapping sequences, two putative full-length ORFs, *BmAOX1* and *BmAOX2*, were generated. Comparison between these two cDNA

Table 1
Annotation of *B. mori* AOX genomic sequences

Gene name	BGI scaffold Kaiko contig	BGF gene	Exon's number
<i>BmAOX1</i>	Scaffold 005125	Bmb019083	8, 9, 10, 11, 12, (13)
	Scaffold 007730	Bmb025000	1, (2), (3), (4), 5, 6, 7
	Scaffold 006032	Bmb021327	14, 15, 16
	Contig 170004	–	(8), 9, 10, 11
	Contig 473130	–	5, 6
<i>BmAOX2</i>	Scaffold 005125	Bmb019080	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, (9)
	Scaffold 012488	Bmb033139	8, (9), (10), (11), (12), 13, 14, 15, 16
	Contig 434984	–	7, 8, 9, 10, 11, 12, (13)
	Contig 582492	–	4, 5
	Contig107265	–	(13), 14
<i>BmAOX3</i>	Scaffold 003590	Bmb014891	(2), 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, (12), 13, 14
	Contig 538052	–	(13), 14, 15
	Contig 271366	–	12, (13), 14
<i>BmAOX4</i>	Scaffold 002098	Bmb010063	(5), 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
	Contig 501947	–	6, 7, 8, 9, 10
<i>BmAOX5</i>	Scaffold 001739	–	9, 10, 11, 12, 13, 14
<i>BmAOX6</i>	Scaffold 003495	Bmb014617	(1), 2, 3

Sequences were retrieved either from Beijing Genomics Institute (BGI scaffolds and corresponding Bmb genes from Beijing Gene Finder, BGF, when available) and from the Silkworm Genome Research Program (Kaiko contigs). The numbers of the corresponding exons are indicated, those between brackets being incomplete or missing.

sequences and the genomic data from the scaffolds/contigs allowed identifying the intron/exon structure of the corresponding genes.

2.6. Analysis of *BmAox1* and *BmAox2* transcripts by northern-blot

Equal amounts of total RNAs (20 µg/lane) from male and female antennae, male legs, wings, thorax and abdomens and female pheromone glands were separated on a 1% formaldehyde gel and transferred onto positively charged nylon membranes. Two specific digoxigenin (Dig)-labeled probes were produced by PCR using the recombinant PCR[®]-II-*AOX1* and *AOX2*-plasmids as matrix and the primers designated for Bmb019083 and Bmb019080 cloning. The membranes were hybridized with anti-*BmAox1* probe or anti-*BmAox2* at 50 °C as described in (Maibèche-Coisne et al., 2004). *BmRpL8* was used as a control probe at 45 °C. RNA molecular weight marker II digoxigenin-labeled (Roche) was used to assess the size of the *AOX* transcripts.

2.7. In situ hybridization of *BmAox1* and *BmAox2*

The pCR[®]-II-*AOX* recombinant plasmids were amplified by PCR using M13 forward and reverse primers. The corresponding PCR products were used as templates to generate sense and antisense Dig-labeled RNA probes by *in vitro* transcription using T7 and SP6 RNA polymerase (Promega) following the manufacturer's protocol. Antennae from 3-day-old male moths were embedded in Tissue-Tek medium[™] compound (Jung). Cryosections of antennae (5 µm) were mounted on superfrost slides (Menzel-Glaser), air dried for 10 min and stored at -80 °C until use. For experiment, slides were warmed at room temperature for 30 min and rinsed twice in PBS for 5 min and twice in 2X SSC for 5 min. Slides were first incubated in a humid chamber for 1 h at 45 °C in hybridization solution (50% formamide, 5X SSC, 100 µg/µl yeast tRNA, 50 µg/µl heparin, 0.01% tween 20), then hybridization was conducted overnight at 45 °C in the same solution containing the labeled probe. Post-hybridization, slides were washed 10 min in 2X SSC, twice in 0.1X SSC for 30 min at 65 °C and 5 min in PBS. Slides were treated with 0.5% blocking reagent (Roche) for 30 min at room temperature and with anti-Dig AP conjugated antibody diluted 1/500 for 30 min at room temperature. After 5 min washing in detection buffer (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0.1% tween 20, 2 mM levamisole), hybridized probes were visualized by incubation in

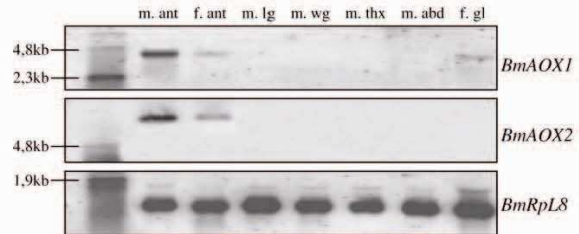


Fig. 2. Northern-Blot analysis of *BmAox1* and *BmAox2* throughout the body, with the same tissue abbreviation as in Fig. 1. m, male; f, female. *BmRpL8* is used as control.

the dark with NBT-BCIP as substrates in detection buffer. Reaction was stopped by rinsing slides in detection buffer and then in PBS. Finally, slides were mounted and pictures acquired on a microscope (Leica DM 4000 B) and digitalized using Adobe Photoshop[®] 5.0.

3. Results

3.1. Identification of putative *AOX* genes from *B. mori* genome

As indicated in Table 1, several genomic scaffolds and contigs encoding partial sequences of *AOX*-like proteins were identified by conducting TBLASTN searches on the silkworm genome using the sequence of *M. brassicae* *AOX* fragment. In particular, one genomic fragment of 25,241 bp (scaffold 005125) contained putative exons for two distinct *AOX* genes, which were qualified as Bmb019083 and Bmb019080 in the BGI website. These two fragments encoded incomplete putative proteins that had been automatically classified as putative aldehyde oxidase/xanthine dehydrogenase proteins by the BGI. Bmb019083 and Bmb019080 presented the higher sequence similarities with the antennal-expressed *MbraAOX* from *M. brassicae* and were renamed *BmAox1* and *BmAox2* in our study. Additionally, four other putative partial *AOX* genes were discovered within genomic sequences, *BmAox3* to *BmAox6* (Table 1), encoding partial putative polypeptides of 1177, 985, 701 and 125 amino acids, respectively.

3.2. Selection of antennal-specific *AOX* genes

Tissue-related expressions of the six putative *AOXs* were determined by RT-PCR in order to select the antennal-specific ones, which could be involved in BAL degradation. In addition to antennae, various non-olfactory tissues were used. After RT-PCR, for similar level of the control ribosomal protein gene *RpL8* amplification, *BmAox1* and *BmAox2* appeared to be strongly expressed in antennae of both sexes, with no expression in all other tissues tested, except a faint band observed in female pheromone gland for *BmAox1* (Fig. 1). Expression of *BmAox3*, 4, and 5 was studied by the same way and none of them showed an antennal-specific expression but rather a broad and faint expression profile in both sexes (data not shown). However, despite the use of various primers and RNAs from different tissues, we could never observe *BmAox6*

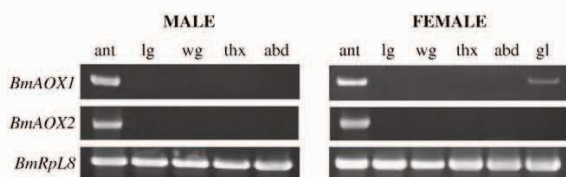


Fig. 1. RT-PCR analysis of *BmAox1* and *BmAox2* expression: cDNAs are amplified with gene specific primers from male and female antennae (ant), legs (lg), wings (wg), thorax (thx), abdomens (abd), and from female pheromone glands (gl). *BmRpL8* ubiquitous gene serves as positive control.

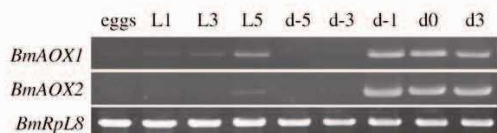


Fig. 3. Expression of *BmAox1* and *BmAox2* during development after RT-PCR. L1 to L5: 1st to 5th instar larvae; (d-5 to d-1): pupae from day 5 to day 1 before eclosion; (d0, d3): newly eclosed and 3-day-old adults.

amplification, suggesting that the corresponding exons were not transcribed at the adult stage or that *BmAox6* could correspond to a pseudogene. Northern blot hybridization confirmed that the newly identified *BmAox1* and *BmAox2* genes are specifically expressed in antennae of both sexes, with here again a faint expression of *BmAox1* in female pheromone gland (Fig. 2). The two transcript sizes (around 4.5kb for *BmAox1* and above 7kb for *BmAox2*) are in good agreement with previous estimation of AOX transcript sizes. For equal amount of RNA loading, *BmAox1* and *BmAox2* signal intensities were clearly higher in male than in female antennae. Moreover, temporal expression of *BmAox1* and *BmAox2* during development revealed that both AOXs are predominantly expressed at the end of the pupal stage and during adult life (Fig. 3). A faint *BmAox1* expression is observed during all larval stages, whereas *BmAox2* is only faintly detected at the fifth instar. In *B. mori*, no biochemical data were available on the expression profile of the antennal AOX during development. Nevertheless, our results are in agreement with the data obtained on *M. sexta*. In this species, the larval stages were not studied, but antennal AOX activity was first detectable about 3 days before eclosion, with a maximum in adults (Rybczynski et al., 1989). This AOX expression is concomitant with the electrophysiological responsiveness to aldehydes and with PBP expression (Györgyi et al., 1988), suggesting a common regulatory pathway for the olfactory genes involved in sex pheromone detection in mature adults.

3.3. Characterization of two antennal putative AOX, *BmAox1* and *BmAox2*

Race PCR-based strategy and subsequent cloning allowed us to obtain the complete sequences of the ORFs of both antennal-expressed genes. *BmAox1* and *BmAox2* cDNAs are 3834 and 3858 bp long, respectively, and their sequences have been deposited into GenBank under the accession numbers EU073423 and EU073424. Comparison between these cDNAs and the genomic sequences on the scaffolds/contigs

led us to annotate the introns/exons structure for both genes (Fig. 4). The genomic organization of *BmAox1* and *BmAox2* presented high similarity with 16 exons and 15 introns, a same orientation and a junction phase conservation. The gene size from the first ATG to stop codon was calculated as 11,350 bp for *BmAox1*. For *BmAox2*, six introns were incompletely sequenced by the BGI and the partial size of the gene is 9496 bp. The cluster length from first ATG of *BmAox1* to the stop codon of *BmAox2* is estimated as 30kb including a distance between the two genes around 10kb. The complete deduced protein of *BmAox1* consisted of 1277 amino acids with a calculated molecular mass of 141.8 kDa, whereas *BmAox2* predicted protein consisted of 1285 amino acids with a molecular mass of 143.3 kDa. These data are in good agreement with the estimates sizes of the monomeric forms of the biochemically isolated AOXs from *B. mori*, *M. sexta* and *A. polyphemus* antennae (Rybczynski et al., 1990, 1989). They are also compatible with the sizes from the AOX cloned from the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Coleman et al., 2002) and from various mammals, whose AOXs are always homodimers consisting of subunits of approximately 150 kDa (Garattini et al., 2003). In order to further support annotation predictions and family classification, CLUSTALW algorithm was used to align the six AOX protein sequences with the two already known xanthine dehydrogenases (XDHs) from *B. mori* (Komoto et al., 1999), which also belong to the MFE family (Fig. 5). MFE proteins share indeed a number of common structural features. Each subunit contains the same conserved structure with a N-terminal domain containing two iron-sulfur (2Fe–2S) redox centers followed by a flavin-containing region (FAD-binding domain) and a C-terminal domain comprising the molybdenum cofactor (MoCo)-binding site within the substrate-binding domain. As shown in Fig. 5, *BmAox1* and *BmAox2* predicted proteins contained all of these conserved domains, including the eight cysteine residues necessary for the coordination of iron ions (Garattini et al., 2003). More importantly, the FAD-binding domain of *BmAox1* and *BmAox2* was lacking the small conserved sequence encoding the NAD-binding site, which is the typical signature of XDHs (Komoto et al., 1999). The tyrosines responsible for binding of NAD in XDHs in the FAD domain were also lacking. Thus, the structural features of *BmAox1* and *BmAox2* deduced proteins indicated that they were members of the MFE family and more precisely of the AOX subfamily. *BmAox3* and *BmAox4* were also structurally closer to AOX rather than to XDH proteins, however, the sequences of *BmAox5* and *BmAox6* were too short and in particular they missed the FAD-binding domain for concluding.

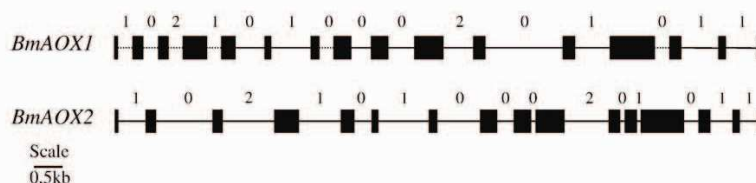


Fig. 4. Schematic representation of *BmAox1* and *BmAox2* genomic organization. Solid blocks represent exons. Introns of known sizes are indicated by full lines whereas dashed lines denote incomplete sequences. The phase of each intron/exon junction is indicated numerically above each intron.

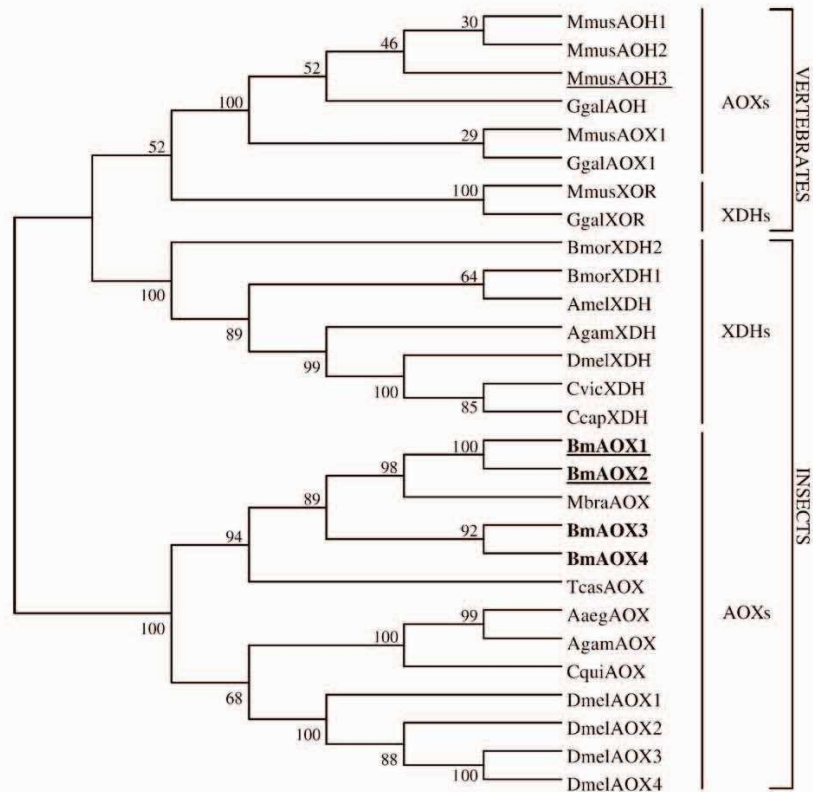


Fig. 6. Phylogenetic analysis of silkmoth AOXs and XDHS with various MFE's. The following sequences have been used (species name, protein name, Genbank accession number): *M. brassicae*, MbraAOX, AAY22446; *C. quinquefasciatus*, CquiAOX, AAF87601; *Anopheles gambiae*, AgamAOX, XP_316291; AgamXDH, AAO14865; *Aedes aegypti*, AaegAOX, EAT37664; *D. melanogaster*, DmelAOX1, AAF55207; DmelAOX2, AAF55208; DmelAOX3, AAF55209; DmelAOX4, AAF55210; DmelXDH, CAA68409; *Calliphora vicina*, CvicXDH, CAA30281; *Ceratitis capitata*, CcapXDH, AAG47345; *B. mori*, BmorXDH1, BAA21640; BmorXDH2, BAA24290; *Apis mellifera*, AmelXDH, XP_01119950; *Mus musculus*, MmusAOX1, NP_033806; MmusAOH1, NP_076106; MmusAOH2, NP_076120; MmusAOH3, NP_001008419; MmusXOR, NP_035853; *Gallus gallus*, GgalAOX1, DQ150102; GgalAOH, DQ150103; GgalXOR, NP_990458. AOH, aldehyde oxidase homolog; XOR, xanthine oxidoreductase. Proteins selectively expressed in olfactory tissues are underlined.

A phylogenetic analysis of BmAOXs was realized, including the two BmXDHS as well as MFE sequences from other insect and vertebrate species. BmAOX5 and BmAOX6 were not included for the same reasons as previously. The resulting neighbor joining tree (Fig. 6) showed that BmAOX1 and BmAOX2 clustered together and were closer to insect AOXs than to insect XDHS. The two deduced proteins are very close and share 62.5% amino acid identity. Within this AOX insect group, MbraAOX partial polypeptide, also expressed in antennae, was the most closely related to BmAOX1 and BmAOX2. As revealed by high branch support values, this lepidopteran group was clearly separated from the dipteran's one. As previously described, vertebrates AOXs are structurally more similar to vertebrates XDHS than to insect AOXs, which is consistent with the hypothesis of distinct duplication process of MFEs between vertebrates and insects (Garattini et al., 2003; Terao et al., 2006).

3.4. Analysis of BmAOX1 and BmAOX2 expression in antennae

A more precise localization of BmAOX1 and BmAOX2 transcripts within male antennae was achieved using *in situ*

hybridization. *B. mori* antennae are bipectinated, forming a basket shaped structure bearing two rows of antennal branches carrying the olfactory sensilla on their ventral side, the dorsal one being covered by scales. Three major olfactory sensilla types are described: long and short sensilla trichodea and sensilla basiconica (Maida et al., 2005). Male long sensilla trichodea have been reported to respond to the pheromone component BOL and BAL (Kaissling et al., 1978), whereas the sensitivity of the other sensillum types is still unknown. In transversal sections of antennal branches, sense strand control probes gave no signal (not shown) whereas both antisense BmAOX1 and BmAOX2 hybridizations were clearly restricted to the sensilla side of the antennal branch with no signal on the scale side (Fig. 7A and B). Labelling was observed at the bases of olfactory sensilla in cells that could correspond either to ORNs or to accessory cells. Photonic microscopy observations didn't allow discriminating between the different types of sensilla, thus preventing to establish a correlation between the sensillum type and the expression of BmAOX1 and BmAOX2. To clarify this point, RT-PCR analysis on cDNA from isolated male long sensilla trichodea was performed. First experiments were conducted using specific primers allowing amplification of

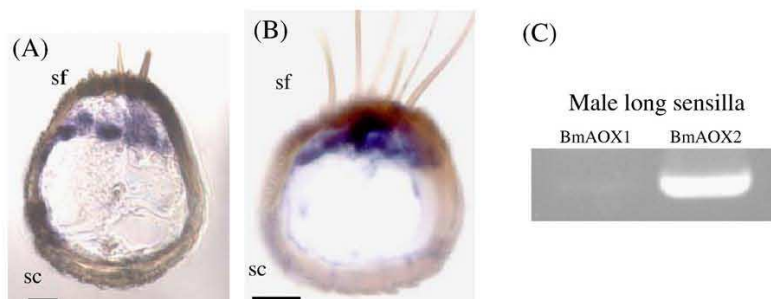


Fig. 7. Expression patterns after *in situ* hybridization of *BmAOX1* (A) and *BmAOX2* (B) on transversal sections of male antennae (sf, sensillar field; sc, scales; scale bars: 30 μ m) and after RT-PCR analysis (C) on isolated male long sensilla trichodea.

the 3 differentially expressed PBPs from *B. mori* (Forstner et al., 2006). Only *BmPBPI*, which is specific from the long sensilla trichodea was amplified (data not shown), confirming the quality of the cDNA. Using the same template, *BmAOX2* appeared strongly expressed in the long sensilla, whereas only a very faint expression of *BmAOX1* was observed (Fig. 6C). These results demonstrated that *BmAOX2* is expressed in the pheromone-sensitive long sensilla trichodea, which are a large majority on male antennae, whereas *BmAOX1* is likely predominantly expressed in another sensillum type(s).

4. Discussion

In the present work, we took advantage of the newly released genome of *B. mori* to search by bioinformatic for potential *AOX* genes, in order to characterize at the molecular level the BAL-degrading enzyme previously identified in this species by biochemical approach (Rybczynski et al., 1990). We described the characterization of two *AOXs* expressed in the antennae, one of them being antennal-specific. The work includes the molecular cloning of the two ORFs, the reconstruction of the gene structures and the study of the expression patterns of their transcripts in adults.

MFEs constitute a family of homodimeric oxidoreductases with conserved structural organization and include closely related XDH and AOX members. In the silkworm, two XDH genes were previously characterized (Komoto et al., 1999). Our analysis of the genome revealed the presence of 6 putative *AOX* genes and/or pseudogenes. Among them, we have focused our attention on the antennal-expressed ones, *BmAOX1* and *BmAOX2*. Their ORFs present the typical tripartite structure of MFEs and their assignment to the AOX subfamily is clearly established by the lack of the typical FAD-binding domain from XDHs. *BmAOX1* and *BmAOX2* are co-localized on a chromosomal cluster, present high similarities in sequence and the same intron/exon structure, indicating that they likely originate from gene duplication events, as known for silkworm XDHs or for AOXs from *Drosophila melanogaster* and from vertebrates (Terao et al., 2006). Evolution of MFE genes is complex and characterized by duplication and suppression events. In vertebrates, AOX and XDH genes present amazing structure conservation, with a fixed number of exons and introns (36 exons for XDHs; 35 exons for AOXs) and conserved junction

boundaries between species (Terao et al., 2006). In contrast, insect MFEs display a much larger variability. The number of exons (16) of silkworm *AOXs* is greatly higher than in other known insect AOXs, which possess between 5 to 8 exons (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). In comparison, *B. mori* XDHs possess only 8 exons (Komoto et al., 1999) and all their intron junctions are conserved with vertebrate MFE genes, whereas they share only one junction with *BmAOX1* and *BmAOX2*. *BmAOX1* and *BmAOX2* share 5 junctions with vertebrates MFE genes. Vertebrate MFEs are thus structurally more similar than insect's ones, supporting the view that AOXs have evolved twice independently during the process of MFE gene duplication in metazoa (Rodriguez-Trelles et al., 2003; Terao et al., 2006).

In mammals as in insects, if XDH is well known as a key enzyme for purine catabolism (Pitts and Zwiebel, 2001), the physiological function of AOXs is less defined. In mammals, AOXs are known to oxidize various xenobiotics and physiological compounds (Kitamura et al., 2006) and are probably involved both in detoxication and in development processes as well as in homeostasis (Garattini et al., 2003). However, few functional data are available on AOXs from insects. In the mosquito *C. quinquefasciatus*, an AOX gene potentially involved in insecticide catabolism has been isolated. In the flies *D. melanogaster* and *Musca domestica*, AOX expression patterns suggested that they could have a function during larval development (Coleman et al., 2002). In moths, pioneer studies on pheromone catabolism have demonstrated the role of AOXs in aldehyde pheromone catabolism at the antennal level (Rybczynski et al., 1989, 1990; Tasayco and Prestwich, 1990). In *M. sexta*, *A. polyphemus* and *B. mori*, the antennal AOX activities were demonstrated as antennal-specific, suggesting that the corresponding enzymes may be specialized for playing an active role in the control of odorant concentration. In *M. sexta*, BAL was the best substrate for the antennal-specific AOX, with an estimated half-life *in vivo* of 0.6 ms in the sensilla, suggesting that the antennal AOX can efficiently metabolize physiological amounts of pheromone (Rybczynski et al., 1989). In *B. mori* and *A. polyphemus*, antennal catabolism was studied in less detail but antennal AOXs were also clearly shown to oxidize BAL (Rybczynski et al., 1990). Moreover, in all these moth species, AOX antennal activities were also found in a less extend in females and it was thus suggested that

antennal AOXs could catabolize other non-pheromonal aldehydes that may be important olfactory cues for both sexes (Rybczynski et al., 1989).

In the present study, we found that *BmAox2* transcript is clearly antennal-specific with a major expression during adult stage in males, suggesting that *BmAox2* could encode for the enzyme previously biochemically characterized by (Rybczynski et al., 1990). In *M. sexta* and *A. polyphemus*, AOX activity was found in pure preparations of olfactory sensilla but its precise localisation in *B. mori* has not been established because of insufficient material available (Rybczynski et al., 1990). Here, *in situ* hybridization and RT-PCR experiments showed that *BmAox2* is not only associated with the olfactory field of the antennae but also strongly expressed in the male long olfactory sensilla, which house BOL and BAL-responsive neurons. This expression pattern suggests that *BmAox2* corresponding enzyme could thus play a role in BAL degradation. The faint expression of *BmAox2* observed in female antennae is not conflicting with this hypothesis, since autodection of sex-pheromone components by females, as well as the existence of PBPs in their antennae, have been now demonstrated for numerous moths species (review in Callahan et al., 2000; Hillier and Vickers, 2007), and it cannot be excluded for *B. mori* females.

The another antennal AOX characterized, *BmAox1*, is clearly expressed in the antennae, but it was not amplified after RT-PCR on long trichoid sensilla, suggesting that it is probably associated with another type of sensilla, such as short trichoid and basiconic sensilla, which are also present on male and female antennae (Maida et al., 2005) but whose sensitivities are yet unknown. Nevertheless, even if we cannot exclude an expression of *BmAox2* in other sensilla types than the long ones, our present results indicate clearly that *BmAox1* and *BmAox2* are not co-expressed in the long trichoid sensilla. This observation is concordant with the recent data obtained on the expression pattern of the three PBPs from *B. mori*. BmPBP1 is indeed selectively expressed in the pheromone-sensitive sensilla, whereas BmPBP2 and BmPBP3 are co-localized in other sensillar types, where they are supposed to bind yet unknown components (Forstner et al., 2006). In rodents, four AOX genes were identified, and all of them have broad substrate specificities but tissue- and cell-specific expression, suggesting specific local metabolism (Garattini et al., 2003). In agreement with their differential expression patterns, we can suggest that BmAox2 putative enzyme could be specialized in BAL degradation in the pheromone-sensitive sensilla, whereas BmAox1 could act on BAL as on other unknown aldehyde substrates. Interestingly, a faint expression of *BmAox1* is also seen in the female pheromone gland. In the eastern spruce budworm *Choristoneura fumiferana*, which sex pheromone consists of aldehydes, an aldehyde reductase activity has been found in the pheromone gland as well as in antennae (Morse and Meighen, 1984). The same type of enzyme could thus be involved in the control of pheromone concentration, at the antennal as well as at the pheromone-gland level, and BmAox1 is a good candidate for such a purpose.

The availability of an increasing number of genomes from vertebrates led to the identification of AOX genes in various

taxa. Interestingly, in dog and rodents, an AOX presenting an expression restricted to olfactory mucosa has been recently characterized, and the corresponding enzyme has been proposed to be involved in the degradation of aliphatic aldehyde odorants (Kurosaki et al., 2004; Terao et al., 2006). Moreover, the corresponding ortholog gene is inactivated in human and primates, species whose olfactory system is less developed relative to rodents and dogs. Our results on *B. mori* AOXs suggest that despite divergent evolution, AOXs from the MFE family could share a common function in insects and vertebrates, *i.e.* the control of the duration and/or strength of olfactory stimuli.

Acknowledgments

This work was supported by Université Pierre et Marie Curie-Paris6, INRA, ACI JC5249, and a fellowship from the Research Ministry to J. Pelletier. We thank Dr C. Royer for supplying *B. mori*.

References

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Butenandt, A., Beckman, H., Stamm, D., Hecker, E., 1959. Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners *Bombyx mori*: reindarstellung und konstitution. *Z. Naturforsch.*, b 14, 283–284.
- Callahan, F.E., Vogt, R.G., Tucker, M.L., Dickens, J.C., Mattoo, A.K., 2000. High level expression of “male specific” pheromone binding proteins (PBPs) in the antennae of female noctuid moths. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 507–514.
- Coleman, M., Vontas, J., Hemingway, J., 2002. Molecular characterization of the amplified aldehyde oxidase from insecticide resistant *Culex quinquefasciatus*. *Eur. J. Biochem.* 269, 768–779.
- Forstner, M., Gohl, T., Breer, H., Krieger, J., 2006. Candidate pheromone binding proteins of the silkworm *Bombyx mori*. *Invertebr. Neurosci.* 6, 177–187.
- Garattini, E., Mendel, R., Romao, M.J., Wright, R., Terao, M., 2003. Mammalian molybdo-flavoenzymes, an expanding family of proteins: structure, genetics, regulation, function and pathophysiology. *Biochem. J.* 372, 15–32.
- Györgyi, T.K., Roby-Shemkovich, A.J., Lemer, M.R., 1988. Characterization and cDNA cloning of the pheromone-binding protein from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: a tissue-specific developmentally regulated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 9851–9855.
- Hillier, N.K., Vickers, N.J., 2007. Physiology and antennal lobe projections of olfactory receptor neurons from sexually isomorphic sensilla on male *Heliothis virescens*. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* 193, 649–663.
- Kaissling, K.E., Kasang, G., Bestmann, H.J., Stransky, W., Vostrowsky, O., 1978. A new pheromone of the silkworm moth *Bombyx mori*. Sensory pathway and behavioral effect. *Naturwissenschaften* 65, 382–384.
- Kasang, G., von Proff, L., Nicholls, M., 1988. Enzymatic conversion and degradation of sex pheromones in antennae of the male silkworm moth *Antheraea polyphemus*. *Z. Naturforsch.* 43, 275–284.
- Kasang, G., Nicholls, M., von Proff, L., 1989. Sex-pheromone conversion and degradation in antennae of the silk moth *Bombyx mori*. *Experientia* 45, 81–87.
- Kitamura, S., Sugihara, K., Ohta, S., 2006. Drug-metabolizing ability of molybdenum hydroxylases. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 83–98.
- Komoto, N., Yukuhiro, K., Tamura, T., 1999. Structure and expression of tandemly duplicated xanthine dehydrogenase genes of the silk worm (*Bombyx mori*). *Insect Mol. Biol.* 8, 73–83.
- Krieger, J., Raming, K., Breer, H., 1991. Cloning of genomic and complementary DNA encoding insect pheromone-binding proteins: evidence for microdiversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1088, 277–284.

- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150–163.
- Kurosaki, M., Terao, M., Barzago, M.M., Bastone, A., Bernardinello, D., Salmons, M., Garattini, E., 2004. The aldehyde oxidase gene cluster in mice and rats. Aldehyde oxidase homologue 3, a novel member of the molybdo-flavoenzyme family with selective expression in the olfactory mucosa. *J. Biol. Chem.* 279, 50482–50498.
- Maïbèche-Coisne, M., Merlin, C., François, M.-C., Queguiner, I., Porcheron, P., Jacquin-Joly, E., 2004. Putative odorant-degrading esterase cDNA from the moth *Mamestra brassicae*: cloning and expression patterns in male and female antennae. *Chem. Senses* 29, 381–390.
- Maida, R., Mameli, M., Müller, M., Krieger, J., Steinbrecht, R.A., 2005. The expression pattern of four odorant-binding proteins in male and female silkworms *Bombyx mori*. *J. Neurocytol.* 34, 149–163.
- Merlin, C., François, M.C., Bozzolan, F., Pelletier, J., Jacquin-Joly, E., Maïbèche-Coisne, M., 2005. A new aldehyde oxidase selectively expressed in chemosensory organs of insects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 4–10.
- Mita, K., et al., 2004. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.* 11, 27–35.
- Morse, D., Meighen, E., 1984. Detection of pheromone biosynthesis and degradative enzymes in vitro. *J. Biol. Chem.* 259, 475–480.
- Pitts, R.J., Zwiebel, L.J., 2001. Isolation and characterization of the Xanthine dehydrogenase gene of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Genetics* 158, 1645–1655.
- Rodriguez-Trelles, F., Tarrío, R., Ayala, F.J., 2003. Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13413–13417.
- Rybczynski, R., Reagan, J., Lerner, M., 1989. A pheromone-degrading aldehyde-oxidase in the antennae of the moth *Manduca sexta*. *J. Neurosci.* 9, 1341–1353.
- Rybczynski, R., Vogt, R.G., Lerner, M., 1990. Antennal-specific pheromone-degrading aldehyde oxidases from the moths *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 265, 19712–19715.
- Sakurai, T., et al., 2004. Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16653–16658.
- Tasayco, M., Prestwich, G., 1990. Aldehyde oxidases and dehydrogenases in antennae of five moth species. *Insect Biochem.* 20, 691–700.
- Terao, M., Kurosaki, M., Barzago, M., Varasano, E., Boldetti, A., Bastone, A., Fratelli, M., Garattini, E., 2006. Avian and canine aldehyde oxidases. Novel insights into the biology and evolution of molybdo-flavoenzymes. *J. Biol. Chem.* 281, 19748–19761.
- Vickers, N.J., 2006. Winging it: moth flight behavior and responses of olfactory neurons are shaped by pheromone plume dynamics. *Chem. Senses* 31, 155–166.
- Vogt, R.G., 2005. Molecular basis of pheromone detection in insects. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology. Endocrinology*, vol. 3. Elsevier, London, pp. 753–804.
- Vogt, R.G., Riddiford, L.M., 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293, 161–163.
- Vogt, R.G., Kohne, A.C., Dubnau, J.T., Prestwich, G.D., 1989. Expression of pheromone binding proteins during antennal development in the gypsy moth *Lymantria dispar*. *J. Neurosci.* 9, 3332–3346.
- Wanner, K., Anderson, A., Trowell, S., Theilmann, D., Robertson, H., Newcomb, R., 2007. Female-biased expression of odourant receptor genes in the adult antennae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 16, 107–119.
- Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C., Cheng, D., Dai, F., Li, B., 2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* 306, 1937–1940.

**TROISIEME PARTIE. MISE AU POINT D'UN OUTIL
D'ANALYSE FONCTIONNELLE *IN VIVO* PAR LA
TECHNIQUE DE TRANSGENESE CHEZ LE VER A SOIE**

Chapitre I. Introduction et contexte

Les animaux transgéniques représentent des outils très puissants pour analyser la fonction des gènes. Le dernier prix Nobel de physiologie et de médecine a d'ailleurs été décerné en 2007 à M. Capecchi, M. Evans et O. Smithies pour leurs découvertes sur l'utilisation de cellules souches embryonnaires pour introduire des modifications génétiques et invalider des gènes chez la souris [182]. Cette technologie communément appelée knock-out a permis de déterminer les rôles de gènes spécifiques dans le développement, la physiologie et la pathologie sur ce modèle. De plus, des implications dans le domaine médical peuvent être envisagées. Le développement de la technique de transgénèse chez le ver à soie, basée sur l'utilisation du transposon piggyBac qui permet de manipuler génétiquement l'organisme, représente donc un potentiel très intéressant pour analyser fonctionnellement des gènes candidats potentiellement impliqués dans le processus de réception odorante.

L'identification et la caractérisation moléculaire des récepteurs phéromonaux constituaient, au début de ma thèse, un de mes objectifs. Comme on l'a vu, quelques mois seulement après mon arrivée au laboratoire, un groupe de recherche japonais publiait leurs résultats sur l'identification et l'implication de deux gènes de la famille des RCPG, *BmOR1* et *BmOR3*, dans l'interaction plus ou moins spécifique avec les ligands phéromonaux Bol et Bal, respectivement [101] [93]. Si l'identification de ces deux récepteurs phéromonaux représentait une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes de communication phéromonale, leur caractérisation fonctionnelle repose cependant essentiellement sur l'utilisation de systèmes d'expression hétérologue, tels que des oocytes de xénopes [101] ou des lignées cellulaires HEK 293 modifiées [71], ou alors par expression de façon stable *in vivo* dans le système « empty neurone » de drosophile [73]. L'utilisation de tels systèmes « reconstitués » pour analyser la fonction de gènes n'est pas sans poser quelques problèmes. En effet, ces systèmes ne possèdent pas les mêmes intervenants moléculaires que ceux de l'organisme étudié, ce qui peut mener à une interprétation erronée ou incomplète des résultats obtenus.

Une expression en système lépidoptère apparaît comme un système de choix pour l'étude des RO de lépidoptères, et en particulier des RP. Le modèle *B. mori*, qui présente l'avantage de posséder une communication phéromonale très sensible et spécifique, et surtout très bien caractérisée au niveau physiologique et moléculaire, fournit donc un outil, l'antenne, qui est une véritable machinerie orientée vers la réception de la phéromone. Le développement d'un tel système d'expression stable *in vivo* chez ce lépidoptère constitue une approche intégrée, complémentaires des approches décrites ci-dessus, et réellement novatrice pour analyser la fonction des gènes impliqués dans la réception phéromonale chez ce papillon, et chez les lépidoptères en général. En effet, ce modèle permettra d'étudier des gènes olfactifs au niveau fonctionnel, par des approches électrophysiologiques validées (EAG et SSR), spécifiques, et faciles à mettre en œuvre. La mise au point de cette technique n'aurait pas pu se faire sans la collaboration de Corinne Royer de l'Unité Nationale Séricicole (UNS), spécialiste de la transgénèse chez *B. mori* [13], et qui a permis de rendre ce projet réalisable. Il faut savoir que la transgénèse chez le ver à soie n'est pas aussi aisée à pratiquer que chez la drosophile. D'abord, la technique d'injection dans les œufs demande un savoir-faire spécifique, qui nécessite du temps afin de l'acquérir. Ensuite, le temps de génération est beaucoup plus long chez le ver à soie où plus de six semaines sont nécessaires pour obtenir les

premiers adultes après la ponte. De plus, la période d'injection des œufs pour la transgénèse est limitée au cours de l'année, elle ne peut en effet avoir lieu que lorsque les individus sont nourris avec des feuilles de mûrier blanc, leur alimentation naturelle. En fait, l'efficacité de cette technique dépend grandement de l'alimentation des insectes qui sont nourris sur milieu artificiel de l'automne à l'hiver. Enfin, dans le cas du système UAS/Gal4, la nécessité de réaliser des croisements entre lignées UAS et Gal4 rend la procédure encore plus longue que pour la transgénèse classique.

Afin de mettre au point ce système d'expression stable, nous avons utilisé comme transgène la partie codante du récepteur au Bol, *BmOR1*, un RP mâle-spécifique qui a été caractérisé fonctionnellement, sous le contrôle de deux promoteurs différents : celui du gène de l'actine cytoplasmique *BmA3*, pA3, déjà caractérisé [22] [13], et celui, encore inconnu, du récepteur olfactif atypique *BmOR2*, exprimé dans tous les NRO des antennes mâles et femelles, pOR2 [105]. Cela permettra à terme de comparer l'efficacité d'un promoteur ubiquitaire (pA3) à celle d'un promoteur spécifique des NRO (pOR2), qui constitue un véritable marqueur neuronal. Il existe actuellement très peu de données sur les régions promotrices des gènes chez les insectes (hors drosophile) et les programmes bioinformatiques de prédiction théorique de ces régions sont encore assez peu fiables pour les génomes de lépidoptères. Dans le doute, nous avons utilisé la séquence génomique de trois milles nucléotides, située directement en amont de l'ATG du gène *BmOR2*, qui devrait probablement contenir sa région promotrice. Cette séquence de 3kb est actuellement en cours d'insertion dans le vecteur receveur et n'a donc pas pu être testée dans le temps dévolu à ma thèse.

Pour mettre au point cet outil d'analyse fonctionnelle, nous nous sommes focalisés sur les effets induits par l'expression du transgène OR1 chez les femelles, qui n'expriment pas de façon naturelle ce RP mâle-spécifique, et qui ne répondent pas à leur propre phéromone. Ce choix permet de contrôler à la fois l'efficacité du système d'expression par PCR, et de s'assurer que les réponses électrophysiologiques éventuelles des femelles transgéniques au Bol ou au Bal soient réellement induites par l'expression d'OR1.

Nous avons utilisé deux systèmes différents d'expression du transgène sous le contrôle de pA3, l'un « direct » (insertion d'un bloc [pA3-OR1] dans le génome pour générer la lignée correspondante), l'autre bénéficiant d'une transactivation basée sur le système UAS/Gal4, décrit dans l'introduction bibliographique (croisement de lignées effectrices [UAS-OR1] par des lignées activatrices [pA3-Gal4] pour obtenir des lignées hybrides [H-pA3-OR1] possédant les deux transgènes). L'intérêt d'utiliser ces lignées hybrides dans notre étude réside bien entendu dans l'amplification attendue du niveau d'expression du transgène par ce système de transactivation, mais aussi, à terme, de pouvoir cibler l'expression, comme chez la drosophile. L'utilisation de ces deux systèmes d'expression a permis de générer plusieurs lignées transgéniques possédant chacune ses propres caractéristiques génétiques.

L'efficacité de cette approche dans l'étude fonctionnelle *in vivo* d'un récepteur olfactif a été testée en deux étapes. D'abord, l'expression du transgène OR1 dans les antennes femelles a été mesurée par RT-PCR standardisée, couplée à une quantification optique par densitométrie des produits d'amplification sur gel, après normalisation par un gène ubiquitaire, *BmRpL8*. Ensuite, l'étude de la réponse des femelles transgéniques exprimant

OR1 dans leurs antennes a été étudiée en électroantennographie (EAG) en stimulant les antennes de ces femelles par les composés phéromonaux Bol et Bal, la spécificité de BmOR1 étant toujours controversée. Nous avons utilisé lors de cette étude une technique d'enregistrement EAG sur antenne isolée de femelle, puis utilisé l'autre antenne pour estimer l'expression du transgène par une méthode standardisée, afin de comparer les différentes lignées entre elles. Cette méthode nous a donc permis de mesurer à la fois l'expression du transgène et la réponse électrophysiologique chez une même femelle, et ainsi d'établir une corrélation éventuelle entre les deux. Nous verrons que les résultats obtenus, bien que contrastés, sont néanmoins prometteurs.

Pour ce travail, j'ai moi-même généré les constructions transgéniques, estimé l'expression du transgène dans une antenne par une méthode standardisée, et établi les rapports OR1/RpL8, afin de comparer l'efficacité de la transgénèse pour différentes lignées. Pour sa part, Corinne Royer a effectué les injections des vecteurs de transformation, élevé les différentes lignées transgéniques à l'UNNS, et a assuré la reproduction des individus afin de maintenir les lignées. Enfin, Philippe Lucas a réalisé, avec ma participation, l'analyse fonctionnelle par des enregistrements EAG des antennes femelles transgéniques stimulées par du Bol et du Bal à différentes doses.

restriction (formant des sites de clonage multiples : SMC), un gène de résistance à l'ampicilline (utile pour cribler les bactéries ayant intégré le vecteur), ainsi que le gène rapporteur de la Green Fluorescent Protein (GFP) sous le contrôle du promoteur artificiel 3P3 [18]. Cette association du promoteur 3P3 avec la séquence codante de la GFP permet de cribler simplement les individus transgéniques de façon précoce dans le développement. En effet, l'expression de la GFP sous le contrôle de 3P3 est visible à travers le chorion dès les premiers stades embryonnaires au niveau des stemmattes et du système nerveux (et plus tard des yeux). PigP25 est également doté de séquences terminales répétées et inversées (ITR, Inverted Terminal Repeat), entourées chacune de la séquence caractéristique TTAA constituant le site cible de l'insertion piggyBac [183]. Ce vecteur doit être injecté en présence d'un autre vecteur dit « helper » qui possède la séquence codante de la transposase, nécessaire pour l'intégration du transgène, qui va s'effectuer au hasard dans la chromatine de l'organisme receveur.

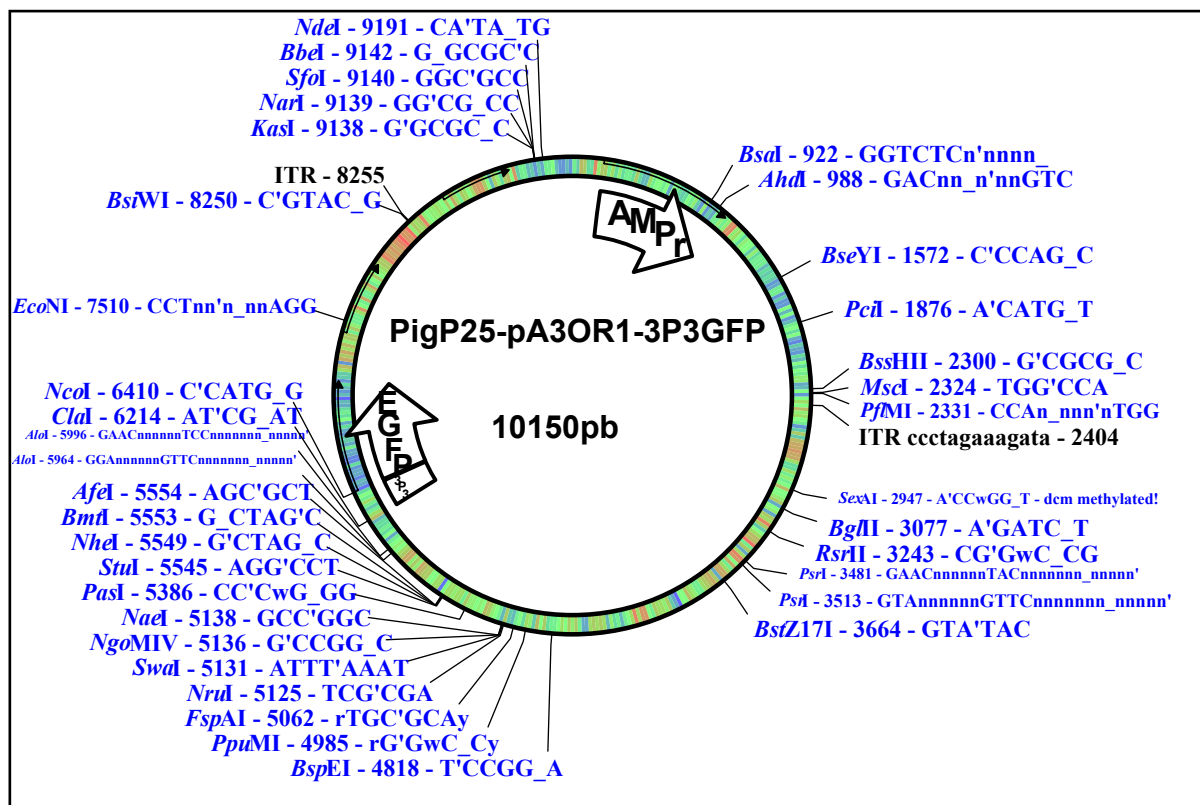
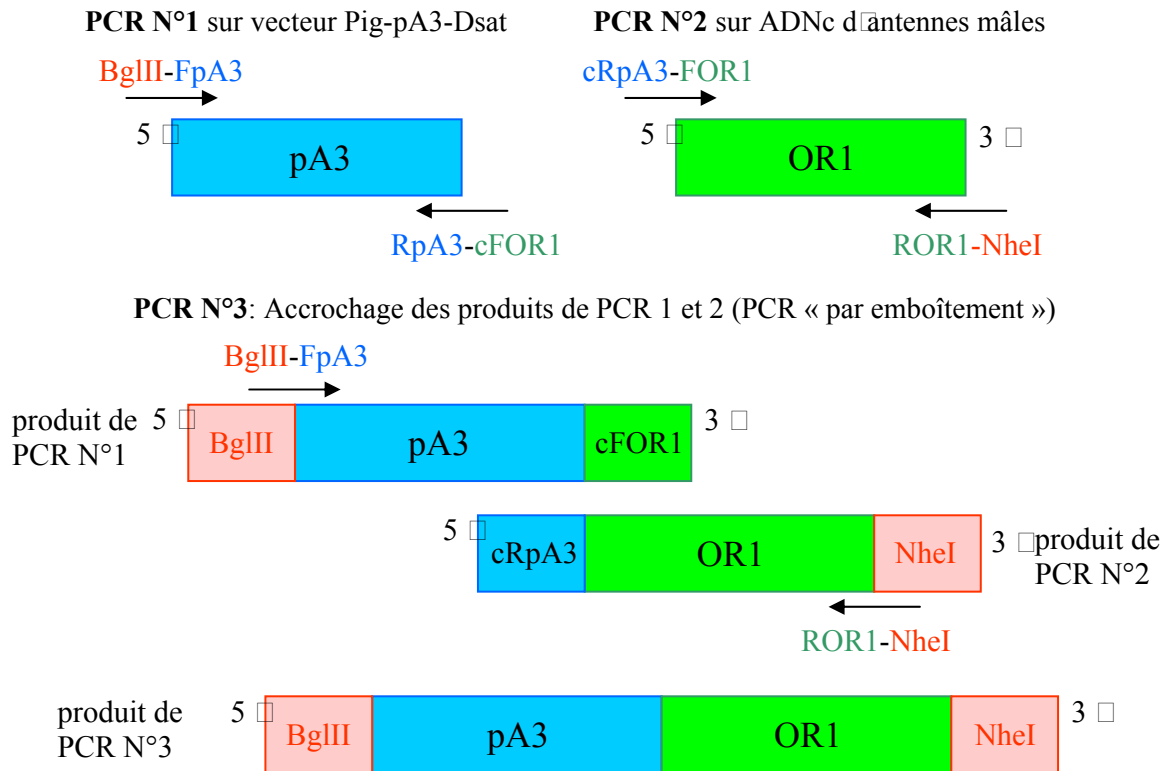


Figure 30. Représentation du vecteur PigP25-pA3OR1-3P3GFP avec la position des sites uniques de restriction BglII (3077), BspEI (4818) et NheI (5549), des séquences ITR, de la séquence codante de la GFP et d'un gène de résistance à l'ampicilline. Image pDraw 32 (Aacloone software, USA).

Deux vecteurs ont été réalisés au laboratoire, Pig-pA3OR1-3P3GFP et Pig-UASOR1-3P3GFP les détails de ces constructions sont présentés respectivement dans les figures 31.1 et 31.2, et dans les paragraphes II.1.2 et II.1.3.

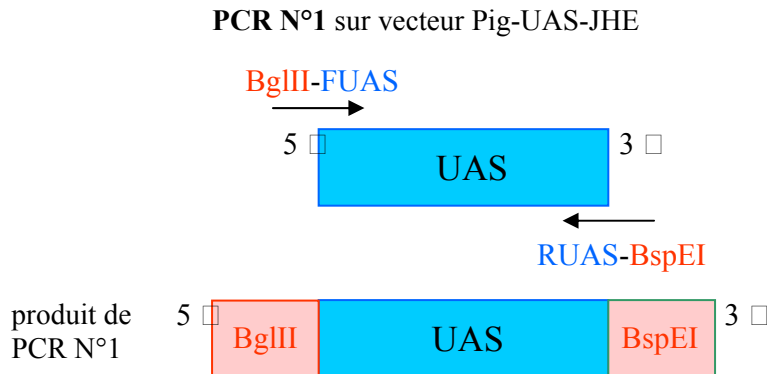
A. Construction du vecteur Pig-pA3OR1-3P3GFP :



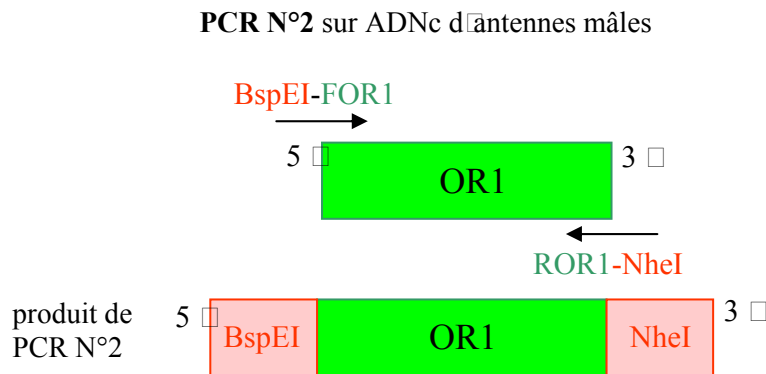
Puis double-digestion **BglIII-NheI** sur le produit de PCR N°3 et le vecteur receveur, le transposon PigP25i1(sp*)IL2-(3P3GFP), puis ligation de l'insert pA3OR1 dans le vecteur et vérification du cadre de lecture par séquençage.

Figure 31.1. Construction du transposon Pig-pA3OR1-3P3GFP (transgénèse directe) (A), avec les amorces décrites dans le tableau 4.

B. Construction du vecteur Pig-UASOR1-3P3GFP :



Puis double-digestion **BglIII-BspEI** sur le produit de PCR N°1 et le vecteur receveur, le transposon PigP25i1(sp*)IL2-(3P3GFP), puis ligation de l'insert dans le vecteur.



Puis double-digestion **BspEI-NheI** sur le produit de PCR N°2 et le vecteur receveur, le transposon PigP25i1(sp*)UAS-(3P3GFP), puis ligation de l'insert OR1 dans le vecteur et vérification du cadre de lecture UAS-OR1 par séquençage.

Figure 31.2. Construction du transposon Pig-UASOR1-3P3GFP (transactivation UAS/Gal4) (B), avec les amorces décrites dans le tableau 4.

II.1.2. Pig-pA3OR1-3P3GFP

Dans ce vecteur, la séquence codante d'OR1 est placée sous le contrôle du promoteur pA3 placé directement en amont (figure 31.1).

La première étape a consisté à amplifier par deux PCR indépendantes les éléments de construction pA3 (promoteur de l'actine *BmA3*) ainsi que OR1, correspondant à la phase ouverte de lecture (de l'ATG au codon stop) du gène *BmOR1*. Le promoteur pA3 a été amplifié à partir du vecteur Pig-pA3Dsats alors que la partie codante du gène *BmOR1* a été amplifiée à partir d'un ADNc d'antennes mâles, en utilisant des amorces choisies de façon à permettre l'accrochage des deux fragments (pA3 et OR1) par l'ajout de séquences

complémentaires de l'une vis à vis de l'autre (amorces hybrides RpA3-cFOR1 et cRpA3-FOR1). Cette PCR « à emboîtement » va permettre de fusionner les deux produits de PCR et de générer le vecteur final.

La deuxième étape a consisté à insérer le transgène pA3-OR1 à l'intérieur du vecteur receveur par l'utilisation des enzymes de restriction BglIII et NheI dont les séquences ont été intégrées aux amorces FpA3 du côté 5' et ROR1 du côté 3'. Ces sites d'enzymes de restriction ont été choisis car ils ne sont présents qu'une fois dans la séquence du vecteur PigP25 et à des positions d'insertion idéales dans le SMC du vecteur. Après double-digestion du transgène pA3-OR1 et du vecteur PigP25 par ces enzymes (formation de « bouts cohésifs »), l'insertion a été réalisée par ligation. La séquence du vecteur Pig-pA3OR1-3P3GFP a ensuite été vérifiée par séquençage (après transformation bactérienne et extraction du vecteur recombinant) afin de contrôler l'intégrité du cadre de lecture pA3-OR1 inséré dans ce vecteur. Le vecteur a été ensuite injecté dans les œufs par Corinne Royer pour générer les lignées [pA3-OR1].

Système de transactivation de l'expression d'OR1 sous pA3 par UAS/Gal4.

Dans ce système, une lignée activatrice exprimant Gal4, un facteur de transcription de levure, sous le contrôle de pA3 sera croisée avec une lignée effectrice contenant un motif nucléotidique de liaison à Gal4, fusionné à la séquence codante du gène *BmOR1*. Après croisement d'individus des lignées activatrices et effectrices, le transgène OR1 chez les descendants sera transcrit suivant le profil d'expression de pA3, en profitant de la transactivation par UAS/Gal4. Afin de vérifier si les lignées résultant du croisement des lignées activatrices et effectrices contiennent les deux transgènes, deux gènes rapporteurs différents ont été utilisés sous contrôle du promoteur 3P3, celui codant pour la GFP (couleur verte), pour les lignées effectrices et celui codant pour la DsRed (couleur rouge) pour les lignées activatrices. Il suffit donc de cribler les descendants dont les ocelles exhibent une fluorescence de couleur jaune (vert GFP + rouge DsRed) pour obtenir des individus hybrides (ayant intégré les deux transgènes) qui constituent les lignées [H-pA3-OR1].

II.1.3. Pig-UASOR1-3P3GFP

Vecteur pour la création des lignées effectrices (figure 31.2).

La création de ce vecteur à partir de PigP25 s'est effectuée en deux temps avec d'abord l'insertion de la séquence UAS entre les sites de restriction BglIII et BspEI puis l'insertion de la séquence codante OR1 entre les sites BspEI et NheI. La première étape a consisté à amplifier la séquence UAS à partir d'un vecteur Pig-UASJHE (fourni par le National Institute of Sericultural and Entomological Science (NIAS), Tsukuba, Japon), par PCR, avec des amorces contenant les sites de restriction BglIII et BspEI du côté 5' et 3' respectivement. Après double digestion du vecteur et du produit de PCR UAS, la ligation a été effectuée et la séquence du vecteur résultant analysée par séquençage. La deuxième étape a consisté à amplifier, à partir d'un ADNc d'antennes mâles, la séquence codante de *BmOR1* à l'aide d'amorces contenant les sites de restriction BspEI et NheI du côté 5' et 3' respectivement. Après double digestion du vecteur contenant l'UAS et du produit de PCR OR1, la ligation a été réalisée et la séquence du vecteur Pig-UASOR1-3P3GFP vérifiée par séquençage (après transformation bactérienne) afin de contrôler l'intégrité du cadre de lecture

UAS-OR1 inséré dans ce vecteur. Le vecteur a ensuite été injecté dans les œufs pour générer les lignées transgéniques [UAS-OR1] qui sont dites lignées effectrices.

Pig-pA3Gal4-3P3dsRed2

Vecteur pour la création des lignées activatrices.

Ce vecteur nous a été fourni par Corinne Royer. Il a été injecté dans les œufs pour générer les lignées transgéniques [pA3-Gal4] qui sont dites lignées activatrices.

II.2. Outils moléculaires utilisés pour la construction des vecteurs

Les amplifications PCR ont été réalisées à l'aide d'une enzyme haute fidélité (Taq Pfu, Invitrogen), selon différentes conditions dictées par les amorces utilisées, la taille du fragment amplifié et l'identité des matrices d'ADN (génomique ou ADNc). Les détails sont donnés dans le tableau 5. La ligation des inserts dans les vecteurs a été effectuée à l'aide du kit T4 DNA ligase (Invitrogen) selon les recommandations du protocole fourni. Les enzymes de restriction BglII, BspEI et NheI (New England Biolabs) ont servi pour réaliser les doubles digestions des inserts et vecteurs, en utilisant les tampons les plus appropriés. Des bactéries TOP10 (Invitrogen) ont été transformées par les différents vecteurs et mises en culture. Le kit Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) a été utilisé afin de récupérer de grandes quantités de vecteurs purifiés pour les injections, selon les recommandations du protocole fourni. Les plasmides purifiés ont ensuite été envoyés à Corinne Royer, de l'UNNS, pour les injections.

A. Pig-pA3OR1-3P3GFP

PCR	T° d'hybridation	Temps d'élongation	Nombre de cycles
1	52°C	1 min 30s	38
2	50°C	2 min	38
3	50°C	3 min	40

B. Pig-UASOR1-3P3GFP

PCR	T° d'hybridation	Temps d'élongation	Nombre de cycles
4	52°C	1 min 30s	38
5	50°C	2 min	38

Tableau 5. Conditions des PCR utilisées pour amplifier les fragments d'ADN utilisés pour les constructions génétiques **A** et **B**. Les PCR 1, 2, 3, 4 et 5 sont décrites dans la figure 31 et dans les paragraphes II.1.2 et II.1.3.

II.3. Injections des constructions transgéniques

La transformation de la lignée germinale de *B. mori* par nos différentes constructions transgéniques a été réalisée par Corinne Royer, sur la souche indienne non diapausante Nistari, selon le protocole suivant. Les vecteurs d'ADN décrits plus haut et les plasmides helper ont été injectés dans des oocytes au stade pré-blastoderme et à une concentration de 0,5

µg/µL. Les œufs injectés ont été incubés à 25°C dans des chambres humides jusqu'à l'éclosion. Les chenilles ont été nourries sur des feuilles fraîches de mûrier blanc (*M. alba*). Les adultes G0 provenant des œufs injectés ont ensuite été accouplés et leur descendance G1 a été criblée, par l'expression positive de la GFP ou de dsRed2 dans les ommatidies, pour récupérer les individus ayant intégré le transgène.

II.4. Estimation de l'expression du transgène OR1 dans une antenne

Afin de vérifier (et plus tard de comparer les taux d'expression) si les femelles issues des différentes lignées transgéniques [pA3-OR1] ou [H-pA3-OR1] exprimaient bien *de novo* le gène *BmOR1* dans leurs antennes, un protocole d'extraction d'ARN sur une seule antenne suivi d'une réaction de RT-PCR sur la totalité de l'ARN extrait a été mise au point dans le but de standardiser les conditions de RT-PCR entre les différentes lignées, afin de pouvoir étudier les animaux individuellement. L'extraction de l'ARN total d'une antenne a été réalisée au TRIzol Reagent (Invitrogen), en utilisant deux fois moins de réactifs que conseillé dans la notice et en limitant le volume final à 10 µL. La synthèse des ADNc à partir de la totalité des ARN totaux obtenus (soit 5µg d'ARN total) a été réalisée dans un volume final de 20 µL en utilisant l'Advantage RT-for-PCR kit (Clontech), avec 0,5 µL d'enzyme reverse transcriptase M-MLV et en suivant le protocole général fourni. Ces ADNc correspondant à une antenne de femelles de différentes lignées ont ensuite été utilisés en PCR.

II.5. Comparaison des lignées transgéniques par PCR

L'insertion du transposon piggyBac s'effectuant au hasard dans le génome de l'organisme receveur, la probabilité qu'elle se fasse dans une région où la chromatine est active est donc complètement aléatoire. C'est pourquoi de nombreuses lignées ont été générées afin d'optimiser nos chances de parvenir à insérer le transgène dans une région où celui-ci sera efficacement transcrit. Les ADNc obtenus à partir d'une antenne de femelles appartenant aux lignées [pA3-OR1] ou [H-pA3-OR1] ont été utilisés en PCR pour comparer les taux d'expression entre ces différentes lignées en utilisant une paire d'amorces spécifiques de *BmOR1* (OR1up : 5'-CCCTCAAAGATGACAGTCGTTTC-3'; OR1down : 5'-CGGTAGAAGATTGAACAGCCC-3'). Les réactions PCR ont été réalisées avec 4 µL d'ADNc d'antenne femelle dans un volume final de 25 µL et avec 0,3 µL de Taq polymérase Titanium (Invitrogen) et à une température d'hybridation de 52°C. Le nombre de cycles a d'abord été testé afin de se placer au cours de la phase exponentielle d'amplification, pour une semi-quantification du matériel contenu dans les ADNc. 32 cycles de PCR ont finalement été utilisés, permettant de comparer les taux relatifs d'expression d'OR1 des différentes lignées testées, après normalisation par *RpL8*. Dans le but de créer les lignées [H-pA3-OR1] les plus efficaces possible, les lignées [UAS-OR1] ont également été testées selon les mêmes conditions afin de repérer celles qui exprimaient le plus le transgène. De même, l'efficacité d'expression des lignées [pA3-Gal4] a été analysée par PCR avec une paire d'amorces spécifiques du gène *Gal4* (Gal4up : 5'-GTCCGATGGCTTGCCCTTCCTCCTG-3'; Gal4do : 5'-ACTGAAGGACGAGGGGAGGTCCT-3') au cours de 32 cycles et à une T° d'hybridation de 60°C. Afin de vérifier la qualité des ADNc, des amorces spécifiques du gène ribosomal *RpL8* ont été utilisés en PCR à 50°C au cours de 32 cycles. La disposition des produits d'amplification sur gels d'agarose a également été réalisée de manière à pouvoir comparer sur le même gel les taux relatifs d'expression des transgènes chez différentes lignées.

II.6. Quantification de l'expression du transgène OR1 sur gel

Les gels à 1,5% d'agarose sur lesquels ont été déposés les produits d'amplification ont été placés après 45 minutes de migration dans le bromure d'éthidium (BET) pendant 10 minutes puis analysés à l'aide d'un imageur Multimage TM Light Cabinet et du logiciel FLUORchem TM 8000 (Alpha Innotech Corporation). Cet outil constitue un système d'imagerie digitale qui permet d'analyser par densitométrie optique les bandes obtenues en PCR. L'outil SPOT DENSO de ce système permet de mesurer la densité d'une bande relativement à d'autres présentes sur le même gel, en tenant compte du bruit de fond inhérent au gel. Cette technique a été utilisée pour comparer les taux d'expression du transgène OR1 afin de sélectionner les meilleures lignées [pA3-OR1] et les meilleures [H-pA3-OR1]. Celles qui exprimaient le plus BmOR1 ont été testées prioritairement en EAG. De plus, ces quantifications optiques ont servi à sélectionner les meilleures lignées [UAS-OR1] et [pA3-Gal4] avant la génération des Hybrides H-pA3-OR1.

II.7. Caractérisation du site d'expression du promoteur pA3 dans les NRO

En parallèle à la génération de ces lignées, l'activité de pA3 a été testée dans les antennes, car bien que considéré comme ubiquitaire, ce promoteur pourrait fonctionner de façon différente en fonction des tissus. Pour cette étude, une lignée pA3-GFP (fourni par l'équipe Assemblage de la Chromatine et Développement (ACD) de l'université Lyon1, France), a été utilisée pour suivre l'expression de la GFP dans les antennes, et en particulier dans les NRO. Différentes techniques ont été utilisées, sur des coupes au cryostat d'antennes et sur des cultures de NRO.

1. Immunocytochimie sur coupes cryostat d'antennes [pA3-GFP] : plusieurs protocoles ont été utilisés

Protocole N°1 en fluorescence : anticorps primaire anti-GFP de souris, puis anticorps secondaire de lapin anti-souris couplé au marqueur fluorescent Alexa 488. Les coupes ont ensuite été visualisées en microscopie optique (Leica DM4000B), en fluorescence.

Protocole N°2 enzymatique : anticorps primaire anti-GFP de lapin, puis anticorps secondaire de souris anti-lapin couplé à l'alkaline phosphatase (AP). Du NBT/BCIP a été utilisé comme substrat de la réaction enzymatique et les coupes ont été visualisées en microscopie optique (Leica DM4000B).

Différentes dilutions d'anticorps ont été testées lors de la réalisation de ces protocoles.

2. Cultures de neurones (réalisées en collaboration avec Philippe Lucas)

Les cultures primaires de neurones olfactifs d'individus [pA3-GFP] ont été préparées par PL. Des antennes de chrysalides âgées de trois jours ont été disséquées. Les cellules d'antennes de même stade ont ensuite subi une dissociation enzymatique et mécanique. Ces cellules dispersées ont été réparties sur des boîtes de pétri, dans un milieu de composition particulière [184]. Les cultures ont ensuite été maintenues dans une atmosphère humide à 20°C. L'expression potentielle de la GFP dans ces neurones en culture a été suivie d'abord

directement, en microscopie optique en fluorescence, puis par détection immunocytochimique de la GFP dans les cultures cellulaires.

II.8. Analyse fonctionnelle par enregistrements EAG à différentes doses de Bol

Cette partie a été réalisée en collaboration avec Philippe Lucas, spécialiste de l'électrophysiologie sur des modèles lépidoptères.

1. Dispositif de stimulation EAG

Les composés phéromonaux Bol et Bal, achetés chez PheroBank (Plant Research International B.V., Pays-Bas), ont été utilisés à différentes concentrations : 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg, 10 µg, dilué dans de l'hexane. Les différentes doses de Bol ou Bal ont été déposées sur des bouts de papier filtre à l'aide d'un capillaire. Après évaporation du solvant, le papier filtre imbibé de Bol ou Bal a été introduit dans une cartouche en verre appelée cartouche de stimulation. La stimulation consiste en un flux d'air passant à travers la cartouche chargée en Bol et dirigée vers l'antenne à tester. La durée de la stimulation a été fixée à une demi seconde au moyen d'une électrovanne. L'antenne est parcourue en permanence par un flux d'air de 0,5 L par minute au cours des enregistrements, afin de nettoyer les antennes avant la prochaine stimulation. Un témoin négatif, constitué par de l'hexane disposé sur un papier filtre, a été utilisé pour stimuler les antennes avant la stimulation par la phéromone.

2. Dispositif d'enregistrement

L'enregistrement des potentiels récepteurs est assuré par deux électrodes de verre qui servent à « brancher » l'antenne. L'électrode de référence est disposée à la base de l'antenne alors que l'électrode d'enregistrement est disposée sur l'extrémité de l'antenne amputée de deux ou trois segments. Toutes deux sont remplies par une solution d'électrolyte, mimant l'hémolymphe des insectes. Cette solution isotonique, dite de Ringer, est constituée de chlorure de sodium (2,25 g/L), chlorure de potassium (0,105 g/L), chlorure de calcium (0,12 g/L) et hydrogénocarbonate de sodium (0,05 g/L). Le signal biologique enregistré est ensuite envoyé vers un oscilloscope (Tektronix 5103) qui permet de visualiser l'amplitude des réponses EAG sur un écran et de les enregistrer dans un fichier informatique. La durée et le débit du flux d'air de stimulation sont mesurés par une sonde à thermistance placée en amont de la cartouche de stimulation.

3. Mise en place des antennes à stimuler

L'enregistrement de l'activité électrique globale (EAG) est possible à partir d'une antenne isolée du reste de l'organisme [185]. Cette stratégie a été utilisée avec *B. mori* tout simplement en raison des difficultés à placer ces animaux dans les blocs de contention en polystyrène. L'antenne à tester est disposée sur un support à environ deux centimètres de la cartouche, et est orientée de façon à ce que le côté portant les sensilles soit directement accessible par le flux d'air.

4. Préparation des animaux et tests EAG

Les mâles et les femelles des différentes lignées transgéniques ont été séparés et maintenus individuellement dans une pièce bien ventilée afin d'éviter toute pré-stimulation par la phéromone. Les antennes des individus transgéniques âgés de deux à trois jours ont

ensuite été testées en EAG dans des conditions maintenues constantes tout au long de l'expérience avec notamment un temps de latence d'une minute entre chaque stimulation. De plus, tout au long des tests, des mâles sauvages ont été testés afin de confirmer le bon fonctionnement du dispositif d'enregistrement. Ces enregistrements de la réponse EAG ont été réalisés à la fois sur des antennes femelles des différentes lignées transgéniques (qui expriment BmOR1 *de novo*) mais aussi sur des antennes mâles de ces mêmes lignées (stratégie de sur-expression chez ces mâles qui expriment de façon naturelle ce RO).

Chapitre III. Résultats et discussions

Lorsque nous avons reçu les premières lignées de *B. mori* transgéniques, nous avons deux objectifs à atteindre. D'abord il a fallu nous assurer, par un protocole standardisé de RT-PCR, que les femelles transgéniques expriment bien le récepteur OR1 dans leurs antennes, mais aussi déterminer quelles lignées sont les plus productives, afin de les tester en priorité au niveau fonctionnel, mais également pour mesurer la valeur ajoutée de la transactivation par le système UAS/Gal4 sur la productivité des lignées correspondantes, par rapport aux lignées [pA3-OR1]. Ensuite, nous avons utilisé les femelles transgéniques pour des tests fonctionnels de réponse à la phéromone en EAG sur antenne isolée, afin de vérifier si l'expression *de novo* d'OR1 induite par transgénèse rend les femelles sensibles aux composés phéromonaux Bol, mais aussi au Bal, car la spécificité de BmOR1 n'est pas encore clairement établie, comme nous l'avons vu lors de l'introduction bibliographique. Les résultats préliminaires obtenus sont décrits dans la partie suivante.

III.1. Injection des vecteurs et création des lignées transgéniques

Le transposon Pig-pA3-OR1-3P3-GFP a été injecté dans 1070 œufs dont 752 ont éclos (70% d'éclosion). Après élevage de cette génération G0, l'émergence de 631 papillons adultes a permis l'obtention de 346 pontes G1 dont vingt-sept étaient stériles. Parmi ces pontes, douze contenaient des individus transgéniques [pA3-OR1] (quatre pour cent d'intégration stable), identifiés précocement grâce à l'expression de la GFP dans les stemmates des embryons. Parmi ces douze lignées, huit ont été étudiées. De la même manière l'injection des transposons Pig-pA3-Gal4-3P3-DsRed2 et Pig-UAS-OR1-3P3-GFP ont généré respectivement quinze lignées [UAS-OR1] et sept lignées [pA3-Gal4]. L'entretien et l'élevage de la totalité des lignées ne pouvant être assuré, dix lignées [UAS-OR1] ont été maintenues. Par ailleurs seules deux lignées [pA3-Gal4] ont pu être sauvegardées à la suite de pertes importantes dans les élevages survenues lors de l'hiver. Les croisements entre les deux lignées activatrices Gal4 et les dix lignées effectrices UAS ont permis de générer vingt lignées hybrides [H-pA3-OR1], possédant les deux transgènes. Au final seize lignées hybrides [H-pA3-OR1] ont été analysées. Le bilan complet des lignées utilisées lors de cette étude est donné dans le tableau 6. La nomenclature utilisée pour désigner les lignées est la suivante, le numéro désigne les individus issus d'une même ponte, qui sont identifiés chacun par une lettre. (On peut noter que quatre lignées [pA3-OR1] et quatre lignées [H-pA3-OR1] n'ont pas été étudiées parce qu'elles ne possédaient pas assez de descendants ou que ceux-ci présentaient des défauts physiologiques au niveau des antennes).

A. Mâles sauvages (témoins positifs pour l'expression d'OR1)

Mâles sauvages [+]	Expression OR1/RpL8	Remarques
Mâle [+] 1	105%*	
Mâle [+] 2	89,9%	
Mâle [+] 3	96,7%	Pas sur la figure 32
Mâle [+] 4	93,5%	Pas sur la figure 32
Moyenne	96,3%	

B. Femelles des lignées [pA3-OR1] (transgénèse « directe »)

Lignée [pA3-OR1]	Expression OR1/RpL8
62A	62,3%
97C	67,5%
97I	71%
104L	78%
119C	85,4%
144B	73,6%
168J	71,6%
189A	88,8%*
Moyenne	74,7%

C. Femelles des lignées hybrides [H-pA3-OR1] (transactivation par UAS/Gal4)

Lignées hybrides [H]	Expression OR1/RpL8	Désignation	Remarques
A12-a	87,2%*	H-a	Issue de [pA3-Gal4] 121A
B9-b	84%	H-b	Issue de [pA3-Gal4] 121A
A11-c	80%	H-c	Issue de [pA3-Gal4] 121A
A2-d	80%	H-d	Issue de [pA3-Gal4] 121A
C4-e	83,2%	H-e	Issue de [pA3-Gal4] 121A
C5-f	79,5%	H-f	Issue de [pA3-Gal4] 121A
A19-g	82,2%	H-g	Issue de [pA3-Gal4] 121A
B6-h	85,5%	H-h	Issue de [pA3-Gal4] 121A
B26-i	84,9%	H-i	Issue de [pA3-Gal4] 121A
B13-j	77,2%	H-j	Issue de [pA3-Gal4] 121A
Moyenne	82,6%		
A12-A	92,6%	H-A	Issue de [pA3-Gal4] 37A
B9-B	83,1%	H-B	Issue de [pA3-Gal4] 37A
A11-C	91,3%	H-C	Issue de [pA3-Gal4] 37A
C4-D	98,3%*	H-D	Issue de [pA3-Gal4] 37A
A19-E	94,5%	H-E	Issue de [pA3-Gal4] 37A
B13-F	95,8%	H-F	Issue de [pA3-Gal4] 37A
Moyenne	92,6%		

D. Femelles des lignées [pA3-Gal4] (lignées activatrices)

Lignées [pA3-Gal4]	Expression Gal4/RpL8	Remarques
10A	72,8%	Lignée perdue
14A	67,%	Lignée perdue
24A	41%	Lignée perdue
37A	57,7%	Utilisée pour croisements
121A	41,8%	Utilisée pour croisements
50D	85,9%	Lignée perdue
79D	92,5%*	Lignée perdue
Moyenne	65,5%	

E. Femelles des lignées [UAS-OR1] (lignées effectrices)

Lignées [UAS-OR1]	Expression OR1/RpL8	Remarques
A12	63,1%*	Utilisée pour générer H-a et H-A
B9	58,8%	Utilisée pour générer H-b et H-B
A11	56,5%	Utilisée pour générer H-c et H-C
A2	51,6%	Utilisée pour générer H-d
C4	44,7%	Utilisée pour générer H-e et H-D
C5	45,2%	Utilisée pour générer H-f
A19	43,3%	Utilisée pour générer H-g et H-E
B6	44,7%	Utilisée pour générer H-h
B26	41,9%	Utilisée pour générer H-i
B13	34,4%	Utilisée pour générer H-j et H-F
Moyenne	48,42%	

Tableau 6. Bilan des lignées générées par transgénèse qui ont été utilisées dans cette partie (**B, C, D, E**), ainsi que les mâles sauvages utilisés (**A**). Les valeurs estimées d'expression OR1/RpL8 (et Gal4/RpL8 pour les lignées correspondantes) sont données ici pour chaque lignée et en moyenne.

III.2. Expression relative d'OR1 entre lignées transgéniques et avec mâles sauvages

Les valeurs des taux d'expression OR1/RpL8 dans une antenne femelle ont été estimées par la technique de PCR semi-quantitative. Les taux d'expression du transgène OR1 ont été estimés relativement au gène ubiquitaire *BmRpL8*, de façon à normaliser les échantillons. La comparaison de la productivité des différentes lignées pour transcrire OR1 permet de sélectionner celles qui expriment le plus le transgène et donc les plus intéressantes à tester en EAG. Les moyennes ont été établies sur la base de deux individus au minimum.

Les résultats d'expression OR1/RpL8 obtenus sur ces différentes lignées sont regroupés dans le tableau 6. En voici un bref résumé.

A. Mâles et femelles sauvages :

Afin de comparer les résultats obtenus sur les femelles des différentes lignées transgéniques avec des individus non transformés, j'ai caractérisé les taux d'expression OR1/RpL8 chez quatre mâles sauvages exprimant naturellement BmOR1 et chez quatre femelles sauvages, par la même méthode que pour les femelles transgéniques. Les valeurs estimées allaient de 89,9% à 105% avec une moyenne de 96,3% pour les mâles. L'expression d'OR1 chez des femelles sauvages n'a donné, comme attendu, aucun signal OR1 lors des tests en PCR.

B. Lignées [pA3-OR1] :

Sur les douze lignées générées, huit ont été analysées. Les taux d'expression d'OR1/RpL8 vont de 62,3% à 88,8% et la moyenne de ces lignées s'établit à 74,7%.

C. Lignées [H-pA3-OR1] :

Seize lignées hybrides UAS/Gal4 ont été analysées. Les taux d'expression OR1/RpL8 allaient de 77,2% à 87,2% pour les dix lignées résultant du croisement avec 121A avec une moyenne s'établissant à 82,6% alors que les taux d'expression OR1/RpL8 des lignées résultant du croisement avec 37A allaient de 83,1% à 98,3% avec une moyenne s'établissant à 92,6%.

D. Lignées [pA3-Gal4] :

Les sept lignées activatrices obtenues présentaient des taux d'expression Gal4/RpL8 allant de 41% à 92,5% avec une moyenne s'établissant à 65,5%. Malheureusement, seules deux lignées (121A et 37A) ont pu être utilisées pour les croisements avec les lignées [UAS-OR1] car les autres ont été perdues au cours des élevages. Ces deux lignées présentaient des taux d'expression respectifs de 41,8% et 57,7%.

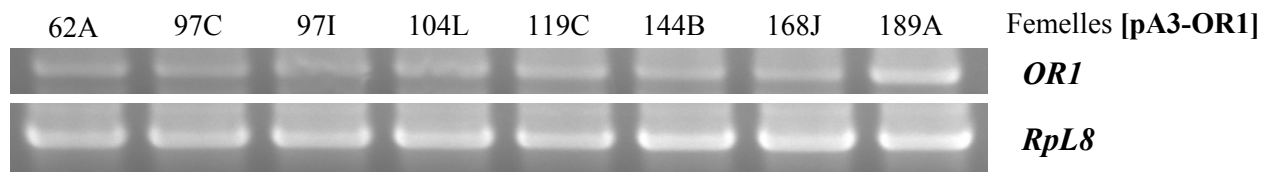
E. Lignées [UAS-OR1] :

Les dix lignées effectrices obtenues présentent des taux d'expression OR1/RpL8 allant de 34,4% à 63,1% avec une moyenne qui s'établit à 48,42%.

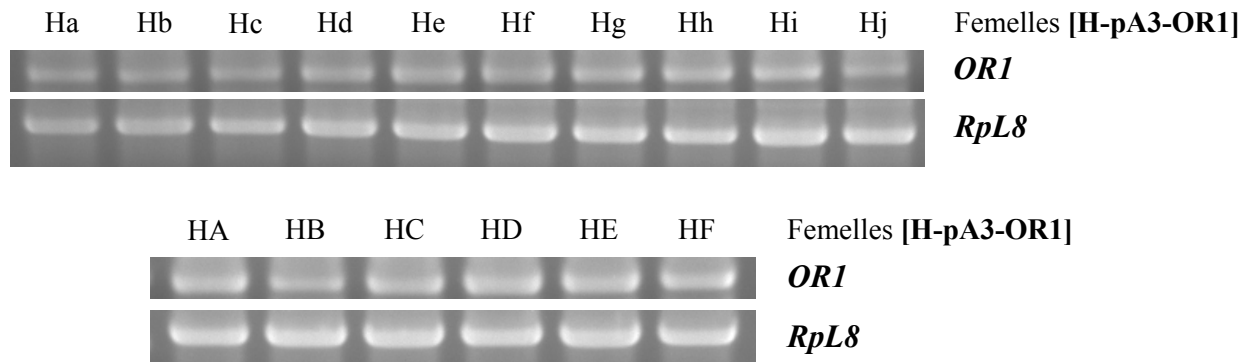
Les résultats montrent une expression du transgène OR1 chez les femelles testées, qu'elles appartiennent aux lignées [pA3-OR1] ou bien aux lignées hybrides [H-pA3-OR1] issues des croisements des différentes lignées [UAS-OR1] avec [pA3-Gal4] 121A et [pA3-Gal4] 37A, comme on peut s'en apercevoir sur la figure 32. En effet, les moyennes du rapport de l'expression OR1/RpL8 vont de 74,7% (pour les lignées [pA3-OR1]) à 82,6% (pour les lignées [H] issus de 121A) et jusqu'à 92,6% (pour les lignées [H] issus de 37A), ce qui est assez proche des moyennes calculées chez les mâles sauvages, 96,3%, ce qui donne une idée plus précise de l'efficacité du système. Les lignées générées les plus productives sont donc celles qui résultent du système de transactivation par UAS/Gal4 (82,6 et 92,6% en moyenne). Les lignées [pA3-OR1] sont légèrement moins productives (74,3% en moyenne pour toutes les lignées) que celles issues des croisements UAS/Gal4, confirmant ainsi un léger gain d'efficacité par la transactivation. Néanmoins, les écarts constatés entre les meilleures lignées [pA3-OR1] et les meilleures [H-pA3-OR1] sont finalement peu importants. Les lignées les plus productives proviennent du croisement des [UAS-OR1] avec [pA3-Gal4] 37A, ce qui est logique car il s'agit de la lignée activatrice la plus efficace (Gal4/RpL8 de 57,7% contre 41,8% pour 121A). La toxicité de la protéine Gal4 pourrait expliquer ces pertes importantes.

Par transgenèse, les taux d'expression obtenus chez les femelles sont donc assez proches de ceux des mâles sauvages, bien que celles-ci n'expriment pas *BmOR1* de façon naturelle. Néanmoins, il ne s'agit ici que d'une estimation relative de l'expression d'OR1, sans grande signification intrinsèque. La technique de PCR semi-quantitative a été utilisée ici en première approximation, afin de cribler et sélectionner les lignées les plus productives pour les analyses fonctionnelles. L'utilisation de la technique PCR quantitative permettrait maintenant d'aller plus loin dans la comparaison des lignées [H] et [pA3-OR1], pour quantifier plus précisément l'avantage d'une telle transactivation chez *B. mori*, mais surtout pour estimer beaucoup plus précisément les taux d'expression entre les femelles transgéniques et les mâles sauvages.

A. Femelles des lignées [pA3-OR1]



B. Femelles des lignées [H-pA3-OR1] issues de la lignée 121A (Ha à Hj), et issues de 37A (HA à HF)



C. Mâles et femelles sauvages

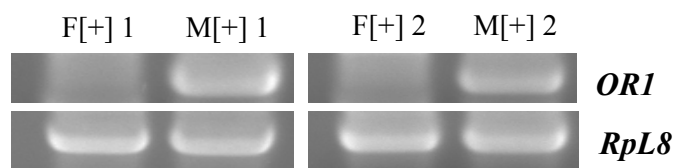


Figure 32. Amplifications PCR des gènes *OR1* et *RpL8* chez des femelles des différentes lignées transgéniques **A** [pA3OR1] et **B** (H-pA3-OR1], ainsi que chez deux mâles (M) et chez deux femelles (F) sauvages [+] (C).

III.3. Réponses électrophysiologiques des femelles transgéniques à la phéromone

III.3.1. Résultats obtenus en EAG

Les antennes femelles des différentes lignées transgéniques exprimant OR1 ont ensuite été utilisées pour réaliser des enregistrements électrophysiologiques en EAG des réponses à la phéromone. Le gène codant pour le récepteur BmOR1 est spécifiquement exprimé dans les antennes mâles, permettant la réponse à la phéromone. Son expression chez les femelles pourrait donc induire une réponse *de novo* des antennes à la phéromone. Ce récepteur ayant été montré comme étant activé par le Bol seul [101] [93], mais peut-être aussi par le Bal [71] [73], on pouvait s'attendre à une réponse au Bol ou aux deux composés de la phéromone chez les femelles transgéniques, ce qui démontrerait l'utilité de cette approche dans l'analyse de la fonction d'un gène *in vivo*. De plus, comme la spécificité de BmOR1 reste controversée, ce

système pourrait permettre de répondre à cette question, en testant les deux composés en EAG sur des femelles qui, naturellement, ne répondent à aucun des composés.

D'abord, les réponses des mâles sauvages au Bol et au Bal ont été mesurées à différentes doses afin de fournir une analyse dose-réponse à comparer avec celles obtenues chez les femelles transgéniques. Le plus souvent, les mâles sauvages commençaient à répondre pour la dose de 10 ng, puis l'amplitude de la réponse augmentait avec la dose, jusqu'à atteindre une réponse maximale pour 10 µg de Bol ou de Bal, qui représente une dose saturante. Cet essai nous a permis de définir les doses à tester pour les femelles transgéniques. Puis, les femelles des différentes lignées ont été testées en EAG à différentes doses de Bol et de Bal. Malheureusement, malgré des enregistrements systématiques de plusieurs dizaines d'individus, aucune femelle testée n'a montré la moindre réponse au Bol ni au Bal en EAG et ce, même pour la dose la plus forte, établie à 10 µg. L'expression du transgène OR1 ayant été vérifiée pour chacune des lignées, les raisons de cet échec pourraient être liées à deux facteurs : d'abord, les paramètres biologiques du système olfactif femelle, qui sont similaires mais différents de ceux du mâle, ensuite, l'utilisation d'un promoteur, pA3, qui serait inadapté pour un tel système d'expression.

III.3.2. Effet du contexte femelle

Si la comparaison des systèmes olfactifs mâles et femelles aux niveaux morphologique, cellulaire et moléculaire laisse apparaître beaucoup de similitudes, des différences sont présentes. Le récepteur BmOR2 est présent dans les antennes femelles où il permettrait, comme chez les mâles, d'adresser correctement les RO à la membrane des NRO mais aussi de les rendre fonctionnel [106] [93]. Le transcrit OR1 disposait donc a priori de toute la machinerie nécessaire pour permettre son intégration dans les dendrites des NRO. C'est d'ailleurs l'avantage d'utiliser un système *in vivo* où une majorité des acteurs moléculaires, y compris BmOR2 sont déjà présents de façon constitutive. Par contre, BmPBP1, qui a été suggérée comme essentielle dans la dynamique de réponse à la phéromone, est beaucoup moins exprimée chez les femelles que chez les mâles [66]. Cette faible expression pourrait expliquer en partie cet échec, car si le récepteur BmOR1 a déjà répondu de façon robuste à la phéromone en absence de BmPBP1, c'était lorsque la phéromone était dissoute dans du DMSO dans des études *in vitro* [72] ou *in vivo* [73]. Enfin, certaines protéines impliquées potentiellement dans les processus de réception de la phéromone ne seraient peut-être pas présentes, ou alors très peu exprimées chez les femelles. Par notre étude sur les SNMP, on peut déjà dire que ce n'est pas le cas de BmSNMP1 et 2, qui sont exprimées de façon équivalente dans les antennes des deux sexes, comme c'est le cas chez d'autres espèces [120] (voir le chapitre III de la deuxième partie). Cependant, c'est peut-être le cas d'autres éléments protéiques non encore identifiés, et qui seraient nécessaires aux mécanismes de réception phéromonale chez le ver à soie.

III.3.3. Effet du promoteur pA3

Si le promoteur pA3 est censé diriger l'expression dans tous les tissus de l'organisme, il n'a jamais été précisé si il pouvait diriger l'expression dans les NRO. Bien que nous ayons vu en RT-PCR une expression d'OR1 dans les antennes sous le contrôle de pA3, les types cellulaires l'exprimant ne sont pas forcément les neurones. Nous avons donc entrepris d'étudier l'expression précise dans les NRO par le promoteur pA3, en caractérisant les sites

d'expression précis du transgène GFP chez une lignée [pA3-GFP], par différentes techniques d'immunocytochimie sur coupes cryostat d'antennes ou sur des cultures de neurones olfactifs, en utilisant des anticorps dirigés contre la GFP. Malheureusement, quelque soit le protocole utilisé, nous n'avons pu localiser aucune expression de la GFP dans les NRO, ce qui semble confirmer que ce promoteur ne dirige pas l'expression dans les NRO, ou alors à des taux en dessous des limites de détection. Ces résultats laissent supposer que pA3 ne dirige pas l'expression de façon équivalente dans tous les tissus, et surtout pas dans les NRO, ce qui n'avait jamais été observé auparavant.

Le RO atypique BmOR2 est présent dans tous les NRO chez les mâles et les femelles [105], et constitue donc un excellent marqueur neuronal. L'utilisation du promoteur pOR2 pour diriger l'expression du transgène OR1 spécifiquement dans les NRO pourrait représenter une amélioration importante pour les futurs essais à venir, et la construction d'une lignée [pOR2-Gal4] pour croiser avec des lignées [UAS-OR1] est d'ailleurs en cours au laboratoire. Les lignées résultantes [H-pOR2-OR1] seront l'objet d'expérimentations futures, selon le protocole décrit ici, qui, je l'espère, constitueront le point de départ d'une utilisation en routine de cet outil d'analyse de la fonction de gènes olfactifs chez le ver à soie. De même, d'autres séquences promotrices, comme pSNMP1, ou même pSNMP2 (qui pourrait aussi être exprimé dans les NRO), pourraient être utilisés dans des constructions pour diriger l'expression d'un transgène dans tous, ou dans certains NRO, de façon spécifique. Cela demanderait néanmoins de tester ces promoteurs au préalable, par exemple avec des constructions pSNMP1-GFP et pSNMP2-GFP.

Chapitre IV. Conclusion et perspectives

Malheureusement, tous les tests en EAG réalisés sur des antennes isolées de femelles des différentes lignées transgéniques n'ont pas permis de détecter la moindre réponse au Bol et au Bal, malgré des taux d'expression du transgène OR1 qui semble être assez comparables à ceux d'un mâle sauvage. Ceci pourrait bien être lié à un mauvais choix de promoteur, ce qui a été confirmé par son étude plus approfondie. Cette semi-réussite constitue tout de même un début prometteur pour ce nouvel outil d'analyse fonctionnelle *in vivo*, de par les taux d'expression estimés du transgène et l'utilisation future de promoteurs plus ciblés des NRO comme pOR2, pOR1 ou encore pSNMP1 ou 2.

Les efforts consentis dans le séquençage des génomes et la construction de banques d'EST antennaires permettent aujourd'hui de voir apparaître un nombre croissant de RO d'insectes appartenant à des ordres différents. Par exemple, quarante-huit RO ont été recensés pour le moment chez *B. mori* [102]. De plus, nous avons identifié à partir du génome plusieurs séquences partielles codant pour des RO chez *B. mori*. Ces séquences pourraient représenter des fragments manquants de certains RO partiels identifiés par ailleurs [102], mais ils pourraient aussi représenter de nouvelles séquences de RO inconnus jusqu'ici. Lorsque le système sera au point, il est déjà envisagé de tester fonctionnellement plusieurs RO d'une autre espèce de lépidoptère, la noctuelle *S. littoralis*. En effet, l'obtention récente d'une banque d'EST (Expressed Sequence Tag) antennaire chez cette espèce a permis d'identifier plusieurs séquences codant potentiellement pour des RP, ainsi que pour des PBP et autres ODE. Une multitude de RO de lépidoptères pourront à terme être analysés grâce à cet outil d'expression *in vivo*, lorsque celui-ci sera complètement opérationnel. De plus il est envisageable de définir les spectres de réponse à différents ligands odorants des RO femelle-spécifique identifiés, en les exprimant chez les mâles cette fois. La plupart de ces récepteurs n'ont pas de ligand connu et leur fonction reste donc à élucider. La compréhension du codage olfactif périphérique passe maintenant par la caractérisation fonctionnelle de ces RO qui sont responsables en grande partie de la spécificité de réponse des NRO.

L'utilisation de systèmes d'expression hétérologues *in vitro* basés sur des lignées cellulaires exprimant le RO à tester constitue le moyen le plus couramment utilisé par les différentes équipes de recherche. Le système d'expression en « empty neurone » chez la drosophile représente un autre outil permettant d'exprimer des RO *in vivo* et a récemment été prouvé, avec BmOR1, comme pouvant accueillir avec succès des RO de lépidoptères [73]. Cependant, ce système a ses limites, en particulier lorsqu'on l'utilise pour tester des RO appartenant à des espèces de différents ordres. Ces systèmes ne peuvent en effet pas prétendre « mimer » fidèlement les systèmes olfactifs des insectes non-diptères.

Le développement d'un outil d'analyse fonctionnelle chez le ver à soie, décrit dans cette partie, constitue le premier système *in vivo* développé chez un lépidoptère. Ce système prometteur, qui nécessite encore de la mise au point, pourrait fournir à terme les moyens de vérifier si la combinatoire du codage olfactif périphérique par les RO, connu chez la drosophile, peut être généralisé à d'autres insectes et notamment des lépidoptères.

Conclusion générale et perspectives

Comprendre la contribution précise des différents acteurs moléculaires impliqués dans la réception périphérique des odorants (OBP, RO, SNMP et ODE) dans la spécificité, la sensibilité et la dynamique de la réponse olfactive constitue un enjeu majeur dans l'étude des processus olfactifs chez les insectes. Le séquençage du génome de la drosophile et le développement de nombreux outils sur ce modèle ont permis ces dernières années d'établir un certain nombre d'avancées dans le domaine des mécanismes de la perception olfactive. Ces études ont également ouvert la voie à de nouvelles avancées chez d'autres espèces, notamment des lépidoptères. Parmi ces espèces, le ver à soie, à la communication phéromonale si sensible et spécifique, est l'objet depuis plus de cinquante ans d'études poussées dans le domaine de l'olfaction. Chez *B. mori*, la phéromone sexuelle est connue, les profils de réponse des NRO à cette phéromone ont été caractérisés, de nombreux gènes olfactifs périphériques ont été identifiés et plus ou moins complètement caractérisés (en particulier : 48 RO dont *BmOR1*, *BmOR2* et *BmOR3*, une PBP, *BmPBP1*, deux GOBP, *BmGOBP1* et *BmGOBP2*, une SNMP, *BmSNMP1* et des activités de dégradation enzymatique de la phéromone ont été identifiées dans les antennes). De plus, le modèle *B. mori* bénéficie de nombreux atouts biotechnologiques comme la transgenèse, qui peut être couplée au système UAS/Gal4 ou à l'ARN interférence, et surtout, le génome séquencé est disponible sur Internet. Toutes ces raisons en font un modèle extrêmement appréciable pour l'étude de l'olfaction, car malgré tout ce qui a été découvert jusqu'ici chez cette espèce, de nombreuses questions restent encore sans réponses.

La réception olfactive périphérique chez les insectes est basée sur des interactions dynamiques, spatiales et temporelles mettant en jeu les molécules odorantes et les différentes familles de protéines olfactives au sein de la lymphé sensillaire. Les gènes olfactifs sont censés réaliser de façon séquentielle la solubilisation, le transport, le largage, la réception du ligand, la transduction du signal et enfin la terminaison du signal chimique. Si les OBP sont maintenant assez bien connues et les RO en passe de l'être, de par le formidable engouement qu'ils suscitent, les ODE et surtout les SNMP le sont beaucoup moins.

J'ai eu la chance au cours de ma thèse de pouvoir étudier de façon plus ou moins approfondie ces quatre grandes familles de gènes olfactifs périphériques chez le ver à soie, en profitant des séquences génomiques disponibles quelques mois seulement avant le début de ma thèse. L'exploitation de ces données par des méthodes bioinformatiques m'a permis d'identifier sur ce modèle deux nouvelles PBP appelées *BmPBP2* et *BmPBP3*, exprimées de façon différentielle dans les antennes des mâles et des femelles, fournissant une nouvelle preuve de l'existence d'une diversité de PBP dans les antennes de lépidoptères. Le fait que ces deux gènes ne soient probablement pas impliqués dans la réception phéromonale au Bol et au Bal, car ils ne sont pas exprimés dans la sensille trichoïde longue mâle sensible à la phéromone, amène à se poser de nouvelles questions pour l'instant sans réponses : *BmPBP1* peut-elle interagir avec les deux composés de la phéromone, alors que la notion de spécificité de liaison des PBP est maintenant bien établie ? Existe-t-il une autre PBP encore inconnue dans cette sensille longue, et capable de solubiliser le Bal ? Des composés phéromonaux encore non identifiés jusqu'ici pourraient-ils interagir avec *BmPBP2* et *BmPBP3* dans un autre type de sensilles ? De façon très intéressante, la forte expression de ces deux nouvelles PBP dans les antennes femelles, couplée à la découverte de plusieurs RO femelle-spécifiques,

suggèrent fortement l'existence d'un système de détection d'odeurs propre à celles-ci, qui pourrait jouer un rôle crucial dans leur comportement au moment de l'oviposition ou de l'accouplement.

Un nouveau membre de la famille des SNMP, *BmSNMP2*, a également été identifié *in silico*. De façon totalement inattendue, ce gène s'exprime dans tous les tissus testés et pas uniquement dans les antennes, contrairement au déjà connu *BmSNMP1* et aux autres SNMP d'autres espèces de lépidoptères, exclusivement localisés au niveau des dendrites des NRO. *BmSNMP2* pourrait ainsi assurer à la fois une fonction dans le transport général de molécules lipidiques dans les tissus non chimiosensoriels, de façon analogue à certains récepteurs CD36 de vertébrés, et un rôle dans la réception olfactive et/ou phéromonale dans les antennes, qui n'est pas à exclure. La très récente découverte de l'implication d'un membre de cette famille dans la perception phéromonale chez la drosophile est en train de décupler l'intérêt suscité par les SNMP chez les lépidoptères, et des projets d'analyse fonctionnelle sont d'ailleurs déjà en cours de réalisation. La compréhension de la fonction précise des deux sous-familles de SNMP pourrait mener à un nouveau modèle plus complet des événements périphériques de la réception odorante et/ou phéromonale chez les lépidoptères.

Mon travail de thèse a également contribué à mettre en évidence une nouvelle ODE appartenant à la classe enzymatique des AOX, sélectivement exprimée dans les organes olfactifs d'un insecte. L'expression de *BmAox2* est restreinte aux antennes, enrichie chez les mâles, et les caractéristiques structurales de la protéine déduite suggèrent que l'enzyme correspondante pourrait être la PDE impliquée dans la dégradation du Bal, caractérisée au niveau biochimique par Rybczynski et al. en 1990. En dépit de la mise en évidence dans les antennes du ver à soie d'activités cataboliques à l'égard du Bol et du Bal par des approches biochimiques, aucun gène codant pour une enzyme antennaire n'avait encore été identifié chez *B. mori*. Lors de cette étude, le développement de la technique de RT-PCR sur sensilles trichoïdes longues mâles a permis de montrer la localisation précise de cette nouvelle enzyme dans ces sensilles sensibles à la phéromone, où elle pourrait être potentiellement impliquée dans la dégradation rapide du Bal. Il reste maintenant à prouver que cette enzyme est effectivement capable de dégrader ce composé phéromonal, et si oui, d'en déterminer la cinétique, afin de vérifier si elle pourrait être impliquée dans l'inactivation très rapide de la phéromone, comme cela a été démontré pour une AOX chez *M. sexta* et pour une estérase chez *A. polyphemus*. Il serait également intéressant de comparer les spécificités de substrat de *BmAox2* avec celles de *BmAox1*, qui est également exprimée dans les glandes phéromonales, et de *BmAox3*, 4 et 5 qui sont faiblement exprimées dans les antennes, car toutes pourraient jouer un rôle olfactif, que ce soit dans la dégradation de phéromones, d'odeurs de plantes, ou de substances toxiques pour les NRO directement exposés aux molécules présentes dans l'environnement.

Si l'identification et la caractérisation fonctionnelle des RP chez le ver à soie devaient constituer le début de mon travail au laboratoire, nous avons rapidement été devancés par des équipes concurrentes, empêchant du même coup la réalisation de ce projet. Néanmoins, nous avons décidé d'exploiter les résultats obtenus par ailleurs pour mettre au point notre propre système d'analyse fonctionnelle *in vivo* de gènes olfactifs, en exprimant *BmOR1*, le récepteur mâle-spécifique au Bol, de façon stable par transgénèse. Les femelles des lignées transgéniques générées exprimaient fortement le transgène *OR1* dans leurs antennes mais se

sont par contre révélées incapables de répondre à la phéromone lors des enregistrements électrophysiologiques. Cette semi-réussite peut néanmoins s'expliquer par l'utilisation d'un promoteur, celui de l'actine, pA3, dont l'utilisation n'a pas permis la localisation correcte du transgène dans les NRO. L'utilisation dans l'avenir de promoteurs plus ciblés comme celui du récepteur atypique pOR2 (cible tous les NRO), ou celui du récepteur phéromonal pOR1 (cible les NRO spécifiques du Bol des sensilles trichoïdes longues mâles), devraient permettre de grandement améliorer le système.

Une fois au point, un tel outil *in vivo*, le premier chez un lépidoptère, pourrait permettre de mieux appréhender la fonction des gènes olfactifs, non seulement chez le ver à soie, mais aussi chez d'autres espèces de lépidoptères. Il est par exemple déjà prévu au laboratoire d'exprimer de façon ectopique chez *B. mori* des RO potentiellement impliqués dans la réception phéromonale chez *S. littoralis*, dont les séquences ont été obtenues par la réalisation d'une banque d'EST d'antennes mâles de cette espèce ravageuse de culture. Le développement de cet outil d'analyse fonctionnelle au cours de ma thèse devrait donc aussi permettre de contribuer à mieux caractériser les RO identifiés chez cette espèce de noctuelle, très étudiée au laboratoire.

La grande diversité de gènes impliqués dans les événements de la réception olfactive périphérique, identifiée maintenant chez de nombreuses espèces d'insectes, supporte bien l'idée d'une certaine sélectivité de ces protéines à l'égard des molécules odorantes, et plus particulièrement des composés phéromonaux. Ainsi, la spécificité des systèmes olfactifs pourrait reposer sur l'intervention de différents filtres plus ou moins sélectifs envers les différents odorants, filtres constitués par les protéines appartenant à ces différentes familles. Dans ce modèle, les OBP transporterait seulement un ou un petit nombre de ligands jusqu'aux RO, qui ne répondraient qu'à une ou à un nombre limité de molécules odorantes. Les ODE appartenant à différentes classes d'enzymes pourraient également intervenir dans ce modèle en dégradant sélectivement les différents odorants entrant dans les sensilles après leur interaction avec les RO. La contribution précise de ces trois familles de protéines dans l'inactivation du signal, primordiale dans la dynamique de la réponse des NRO, reste encore assez mal établie. Si le rôle des ODE semble central dans ce phénomène, les OBP et les RO pourraient également intervenir par le biais de la séquestration des odeurs ou de l'internalisation de celles-ci. L'implication ou non des OBP dans l'activation des RO reste également une question controversée qui pourrait néanmoins bientôt être éclairée par la caractérisation du rôle fonctionnel des SNMP. Cette famille de récepteurs, dont un membre chez la drosophile a été démontré comme essentiel à la perception phéromonale au cVA, agirait potentiellement avec les complexes OBP-ligand pour libérer les molécules odorantes et les rendre disponibles pour interagir avec les RO.

L'étude fonctionnelle de tous ces gènes et de leurs produits va maintenant passer par la manipulation de leur expression *in vivo*, en transgénèse, par expression ectopique ou invalidation par ARN interférence, ou alors *in vitro* par transfection de cultures primaires de neurones olfactifs ou par expression hétérologue en cellules d'insectes. Les modifications physiologiques induites dans les insectes transgéniques ou dans les cultures cellulaires pourront alors être analysées après stimulation odorante, respectivement par des techniques électrophysiologiques *in vivo* (EAG, enregistrements monosensillaires) ou alors par des enregistrements cellulaires *in vitro* en patch clamp et imagerie calcique.

La compréhension globale des mécanismes de la réception olfactive est essentielle tant sur le plan fondamental qu'appliqué. D'une part, les découvertes chez des modèles insectes pourraient permettre de dégager des principes fondamentaux potentiellement applicables à d'autres espèces. D'autre part, les acteurs moléculaires, qui sont à l'origine de la spécificité de la reconnaissance olfactive, représentent des cibles potentiellement très importantes pour le développement futur de nouvelles méthodes de lutte intégrée contre les insectes nuisibles, ravageurs de culture ou vecteurs de maladie, dont l'impact très lourd sur l'économie et la santé humaine dépend principalement de leur fantastique système de perception olfactive.

Pour finir, l'olfaction chez les insectes représente pour moi un domaine de recherche extrêmement stimulant, de par le grand nombre de questions passionnantes qui restent à éclaircir. Certaines de ces interrogations persistent depuis longtemps, mais le développement constant de nouvelles techniques d'études au niveau moléculaires ou biochimiques, souvent très impressionnantes, devraient contribuer à une meilleure compréhension globale de ces mécanismes dans un futur proche.

Annexes, articles de publications en co-auteurs et congrès

Articles de publications en co-auteurs :

Article 1: A new aldehyde oxidase selectively expressed in chemosensory organs of insects (BBRC, 432: 4-10, 2005)

Article 2: Molecular cloning and in Situ expression patterns of two new pheromone-binding proteins from the corn stemborer *Sesamia nonagrioides* (Journal of Chemical Ecology, 32: 1703-1717, 2006)

Article 3: Antennal esterase cDNAs from two pest moths, *Spodoptera littoralis* and *Sesamia nonagrioides*, potentially involved in odourant degradation (Insect Molecular Biology, 16(1): 73-81, 2007)

Participation à des congrès :

Pelletier J., François M.-C., Bozzolan F., Brigaud I., Jacquin-Joly E. and Maïbèche-Coisne M. 2005. Genomic of olfaction in the silkworm, *Bombyx mori*. Poster, 6th Meeting of Invertebrate Neurobiology, Paris, France, June 16-17.

Merlin C., François M.-C., Bozzolan F., **Pelletier J.**, Jacquin-Joly E. & Maïbèche-Coisne M. 2005. A new aldehyde oxidase selectively expressed in chemosensory organs of insects. Poster, IX European Symposium for Insect Taste and Olfaction, Sardinia, Italy, September 24-30.

Pelletier J., François M.-C., Bozzolan F., Merlin C., Brigaud I., Royer C., Lucas P., Jacquin-Joly E. and Maïbèche-Coisne M. 2006. *In vivo* functional analysis of a pheromone receptor by transgenesis in the silkworm, *Bombyx mori*. Poster, Meeting AROMAGRI, Versailles, France, February 1-3.

Pelletier J., François M.-C., Bozzolan F., Merlin C., Brigaud I., Maïbèche-Coisne M., and Jacquin-Joly E. 2006. Identification of candidate pheromone-binding proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. Oral communication, 7th International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera, Orthodox academy of Crete, Greece, August 20-26.

Pelletier J., François M.-C., Bozzolan F., Jacquin-Joly E., and Maïbèche-Coisne M. 2007. First identification of antennal aldehyde oxidases in the silkworm, *Bombyx mori*. Oral communication, 7th Meeting of Invertebrate Neurobiology, Versailles, France, June 3-4.

Pelletier J., François M.-C., Bozzolan F., Solvar M., Jacquin-Joly E., and Maïbèche-Coisne M. 2007. Identification of aldehyde oxidases potentially involved in pheromone degradation in the silkworm, *Bombyx mori*. Oral communication, 10th European Symposium for Insect Taste and Olfaction, Roscoff, France, September 16-21.



Molecular Cloning and *in Situ* Expression Patterns of Two New Pheromone-Binding Proteins from the Corn Stemborer *Sesamia nonagrioides*

Federica de Santis · Marie-Christine François · Christine Merlin · Julien Pelletier · Martine Maïbèche-Coisné · Eric Conti · Emmanuelle Jacquin-Joly

Received: 28 July 2005 / Revised: 7 December 2005 / Accepted: 24 February 2006 / Published online: 2 August 2006
© Springer Science + Business Media, Inc. 2006

Abstract We describe the identification and characterization of two new cDNAs encoding pheromone-binding proteins (PBPs) from the male antennae of *Sesamia nonagrioides*, a species where no PBPs have been identified to date. Because PBPs are thought to participate in the first step of odor detection in a specific manner, we focused our investigation on this olfactory protein family using reverse transcription–polymerase chain reaction strategies. The deduced amino acid sequences of SnonPBP1 and SnonPBP2 revealed mature proteins of 142 and 143 amino acids, respectively, with six cysteine residues in conserved positions relative to other known PBPs. The alignment of the two mature *S. nonagrioides* PBPs with other noctuid PBPs showed high sequence identity (70–80%) with other full-length sequences from GenBank. Sequence identity between SnonPBP1 and SnonPBP2 was only 46%, suggesting that the two proteins belong to different classes of PBPs already described from the Noctuidae. Furthermore, analyses of expression patterns of SnonPBP1 and SnonPBP2 were performed by *in situ* hybridization on antennae of both sexes, and these studies revealed the expression of the two PBPs at the bases of olfactory sensilla (basiconica or trichodea) from both sexes. The possible binding properties of these two new PBPs are discussed according to their homologies with other known PBPs and *S. nonagrioides* pheromone components.

Keywords *Sesamia nonagrioides* · Noctuidae · (Z)-11-hexadecenyl acetate · Pheromone-binding proteins · Molecular cloning · *In situ* hybridization · RT-PCR · Stemborer

F. de Santis · M.-C. François · C. Merlin · J. Pelletier · M. Maïbèche-Coisné · E. Jacquin-Joly (✉)
UMR UPMC-INRA-INAPG «Physiologie de l'insecte: signalisation et communication»,
Centre INRA, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France
e-mail: jacquin@versailles.inra.fr

E. Conti
DSAA-Entomologia, Università degli Studi di Perugia, Borgo XX Giugno, 06121 Perugia, Italy

Present address:
F. de Santis
DSAA-Entomologia, Università degli Studi di Perugia, Borgo XX Giugno, 06121 Perugia, Italy

Antennal esterase cDNAs from two pest moths, *Spodoptera littoralis* and *Sesamia nonagrioides*, potentially involved in odourant degradation

C. Merlin*, G. Rosell†, G. Carot-Sans‡, M.-C. François*, F. Bozzolan*, J. Pelletier*, E. Jacquin-Joly*, A. Guerrero‡ and M. Maibèche-Coisne*

*Unité 1272, UPMC–INRA–INA.PG, Physiologie de l'Insecte: Signalisation et Communication, Centre INRA, France; †Unit of Medicinal Chemistry (Associated with CSIC), Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain; and ‡Department of Biological Organic Chemistry, IIQAB (CSIC), Barcelona, Spain

Abstract

Rapid degradation of odours after interaction with olfactory receptors is a critical step of the signal reception process. However, the implied mechanisms are still largely unknown in vertebrates as well as in insects. Involvement of odourant-degrading enzymes in odourant degradation within the antennae has been shown in some insect species and, in particular, esterases could play a key role in degradation of sex pheromones from Lepidoptera. Using a PCR-based strategy, we isolated cDNAs encoding two new esterases from two moths which used acetates as pheromone compounds: the Egyptian armyworm *Spodoptera littoralis* and the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides*. In antennae, both transcripts were clearly restricted to olfactory sensilla, suggesting their involvement in the degradation of odourant acetate components.

Keywords: odourant-degrading enzymes, antennal esterases, olfaction, Lepidoptera.

Introduction

Sensitive and specific detection of volatile chemical cues is essential for insects to interpret their environment and

communicate with conspecifics. Detection of these chemical signals at the peripheral level takes place in the antennae, where several steps occur successively. While odourant solubilization and delivery by odourant-binding proteins (OBPs) and detection by membrane-bound odourant-receptors (ORs) were intensely studied and, in a large part, deciphered (review in Jacquin-Joly & Lucas, 2005), the last step of odourant degradation is still largely unknown. Efficient degradation of the signal is, however, an integral part of the signal reception and transduction processes. Among the different mechanisms potentially involved in this termination step, enzymatic degradation is certainly the most studied and some odourant-degrading enzymes (ODEs) have been identified in insects, particularly in Lepidoptera (Vogt, 2005). These insects are good models for this purpose because males possess a highly specific and sensitive olfactory system, allowing them to detect small amounts of the sex pheromone released by females. During their flight through the discontinuous pheromone trail, rapid deactivation of the pheromone appears to be crucial for males to obtain a spatial and temporal resolution of this intermittent signal (Vickers, 2006), and to allow the olfactory neurones to respond to frequent periodic stimulations (Vogt & Riddiford, 1981; Vogt, 2003). However, involvement of ODEs in fast pheromone deactivation is still debated, because some authors favour a rapid inactivation by OBPs, followed by enzymatic processes (review in Kaissling, 2001).

Nevertheless, biochemical approaches have led in the past to the identification of ODEs belonging to different families, such as esterases, aldehyde-oxidases, alcohol-oxidases/dehydrogenases or cytochromes P450 (review in Vogt, 2005), a diversity that could be correlated with the variety of chemical structures of pheromones. In pioneering works, esterases from the silkworm *Antheraea polyphemus* were studied two decades ago, and four esterase isozymes were isolated, one from the sensillum lymph (Apol-SE), two from its antennal integument and one from its scales (Vogt & Riddiford, 1981, 1986; Klein, 1987). As the four esterases were able to degrade the ester components of the pheromone blend, it was proposed that Apol-SE removes the

Received 13 June 2006; accepted after revision 1 August 2006; first published online 19 December 2006. Correspondence: Dr Martine Maibèche-Coisne, Unité 1272, UPMC–INRA–INA.PG, Physiologie de l'Insecte: Signalisation et Communication, Route de Saint-Cyr, Bat A, 78026 Versailles Cedex, France. Tel.: +33 1 30 83 32 12; fax: +33 1 30 83 31 19; e-mail: maibeche@versailles.inra.fr

Références bibliographiques

1. Ache, B.W. and J.M. Young, *Olfaction: diverse species, conserved principles*. Neuron, 2005. **48**(3): p. 417-30.
2. Jacquin-Joly, E. and P. Lucas, *Pheromone reception and transduction: mammals and insects illustrate converging mechanisms across phyla*. Current Topics Neurochem., 2005. **4**: p. 75-105.
3. Kaissling, K.E., *Physiology of pheromone reception in insects (an example of moths)*. ANIR, 2004. **6**: p. 73-91.
4. Leal, W.S., *Proteins that make sense*, in *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*, G.J. Blomquist and R.G. Vogt, Editors. 2003, Elsevier Academic Press. p. 447-476.
5. Vogt, R.G., *Biochemical diversity of odor detection:OBPs, ODEs and SNMPs*, in *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology*, G.J. Blomquist and R.G. Vogt, Editors. 2003, Elsevier Academic Press. p. 391-445.
6. Vogt, R.G., *Molecular basis of pheromone detection in insects*. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology, 2005. **3**: p. 753-804.
7. Pelosi, P., et al., *Soluble proteins in insect chemical communication*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(14): p. 1658-76.
8. Jacquin-Joly, E. and C. Merlin, *Insect olfactory receptors: contributions of molecular biology to chemical ecology*. J. Chem. Ecol., 2004. **30**(12): p. 2359-2397.
9. Rutzler, M. and L. Zwiebel, *Molecular biology of insect olfaction: recent progress and conceptual models*. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol, 2005. **191**(9): p. 777-90.
10. Butenandt, V.A., et al., *Über den Sexual-Lockstoff des Seidenspinners Bombyx mori. Reindarstellung und Konstitution*. Z. Naturforsch., 1959. **14b**: p. 283-284.
11. Mita, K., et al., *The genome sequence of silkworm, Bombyx mori*. DNA Res, 2004. **11**(1): p. 27-35.
12. Xia, Q., et al., *A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (Bombyx mori)*. Science, 2004. **306**(5703): p. 1937-40.
13. Tamura, T., et al., *Germline transformation of the silkworm Bombyx mori L. using a piggyBac transposon-derived vector*. Nat. Biotechnol., 2000. **18**(1): p. 81-84.
14. Zhou, Y., *General Entomology*. High Education Publication House, 1958. **2**.
15. Adams, M.D., et al., *The genome sequence of Drosophila melanogaster*. Science, 2000. **287**(5461): p. 2185-95.
16. Rubin, G.M. and A.C. Spradling, *Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors*. Science, 1982. **218**(4570): p. 348-53.
17. Handler, A.M., *Use of the piggyBac transposon for germ-line transformation of insects*. Insect Biochem Mol Biol, 2002. **32**(10): p. 1211-20.
18. Thomas, J.L., et al., *3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm Bombyx mori L. from the embryonic stage onwards*. Insect Biochem Mol Biol, 2002. **32**(3): p. 247-53.
19. Kanginakudru, S., et al., *Targeting ie-1 gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms*. Insect Mol Biol, 2007. **16**(5): p. 635-44.
20. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
21. Imamura, M., et al., *Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm Bombyx mori*. Genetics, 2003. **165**(3): p. 1329-40.
22. Mounier, N. and J.C. Prudhomme, *Differential expression of muscle and cytoplasmic actin genes during development of Bombyx mori*. Insect Biochem, 1991. **21**: p. 523-533.
23. Karlson, P. and M. Luscher, *Pheromones: a new term for a class of biologically active substances*. Nature, 1959. **183**(4653): p. 55-56.
24. Tillman, J.A., et al., *Insect pheromones--an overview of biosynthesis and endocrine regulation*. Insect Biochem Mol Biol, 1999. **29**(6): p. 481-514.

25. Cardé, R.T. and R.E. Charlton, *Olfactory sexual communication in Lepidoptera: strategy, sensitivity and selectivity*, in *Insect communication*, T. Lewis, Editor. 1984, Academic press, London. p. 241-265.
26. Priesner, E., *Correlating sensory and behavioural responses in multichemical pheromone systems of Lepidoptera*, in *Mechanisms in insect olfaction*, T.L. Payne, M.C. Birch, and C.E.J. Kennedy, Editors. 1986, Clarendon Press, Oxford. p. 225-233.
27. Murlis, J. and C.D. Jones, *Fine-scale structure of odour plumes in relation to insect orientation to distant pheromone and other attractant source*. *Physiol. Entomol.*, 1981. **6**: p. 71-86.
28. David, C.T. and J.S. Kennedy, *The steering of zigzagging flight by male gypsy moths*. *Naturwissenschaften*, 1987. **74**: p. 194-196.
29. Murlis, J., J.S. Elkinton, and R.T. Cardé, *Odor plumes and how insects use them*. *Annu. Rev. Entomol.*, 1992. **37**: p. 505-532.
30. Baker, T.C. and K.F. Haynes, *Manoeuvres used by flying male oriental fruit moths to relocate a sex pheromone plume in an experimentally shifted wind-field*. *Physiol. Entomol.*, 1987. **12**: p. 263-279.
31. Baker, T.C. and R.G. Vogt, *Measured behavioural latency in response to sex-pheromone loss in the large silk moth *Antheraea polyphemus**. *J. exp. Biol.*, 1988. **137**: p. 29-38.
32. Fonagy, A., et al., *Pheromone-producing cells in the silkworm, *Bombyx mori*: identification and their morphological changes in response to pheromonotropic stimuli*. *J Insect Physiol*, 2000. **46**(5): p. 735-744.
33. Ichikawa, T., *Activity patterns of neurosecretory cells releasing pheromonotropic neuropeptides in the moth *Bombyx mori**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(7): p. 4055-60.
34. Kaissling, K.-E. and G. Kasang, *A new pheromone of the silkworm moth *Bombyx mori*. Sensory pathway and behavioral effect*. *Naturwissenschaften*, 1978. **65**: p. 382-384.
35. Butenandt, A., *Bombycol, the sex-attractive substance of the silkworm, *Bombyx mori**. *J. Endocrinol.*, 1963. **27**: p. 9-16.
36. Krieger, J., et al., *Candidate pheromone receptors of the silkworm *Bombyx mori**. *Eur. J. Neurosci.*, 2005. **21**(8): p. 2167-2176.
37. Steinbrecht, R.A., *Der feinebau olfaktorischer sensillen des Seidenspinners (*Insecta, Lepidoptera*)*. *Z. Zellforsch.*, 1973. **139**: p. 533-565.
38. Maida, R., et al., *The expression pattern of four odorant-binding proteins in male and female silk moths, *Bombyx mori**. *J Neurocytol*, 2005. **34**(1-2): p. 149-63.
39. Steinbrecht, R.A., *[The fine structure of olfactory sensilla in the silk moth (*Insecta, Lepidoptera*). Receptor processes and stimulus conduction apparatus]*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 1973. **139**(4): p. 533-65.
40. Kaissling, K.E. and E. Priesner, *[Smell threshold of the silkworm]*. *Naturwissenschaften*, 1970. **57**(1): p. 23-8.
41. Priesner, E., *Progress in the analysis of pheromone receptor systems*. *Ann. Zool. Ecol. anim.*, 1979. **11**(4): p. 533-546.
42. Pophof, B., *Olfactory responses recorded from sensilla coeloconica of the silkworm *Bombyx mori**. *Physiol. Entomol.*, 1997. **22**: p. 239-248.
43. Schneider, D., *Electrophysiological investigation on the antennal receptors of the silk moth during chemical and mechanical stimulation*. *Experientia*, 1957. **13**(2): p. 89-91.
44. Schneider, D. and J. Boeckh, *Rezeptorpotential und Nervenimpulse einzelner olfaktorischer Sensillum der Insektenantenne*. *Z. vergl. Physiol.*, 1962. **45**: p. 405-412.
45. Heinbockel, T. and K.-E. Kaissling, *Variability of olfactory receptor neuron responses of female silkworms (*Bombyx mori* L.) to benzoic acid (\pm)-linalool*. *J. Insect Physiol.*, 1996. **42**(6): p. 565-578.
46. Heinbockel, T. *Olfactory receptor cell responses of female silkworm *Bombyx mori* L.: variability, sensitivity, inhibition*. in *Proc. ECRO IX*. 1990.
47. Phelan, P.L. and T.C. Baker, *Evolution of male pheromones in moths: reproductive isolation through sexual selection ?* *Science*, 1987. **235**: p. 205-207.
48. Kanzaki, R., et al., *Projections to higher olfactory centers from subdivisions of the antennal lobe macroglomerular complex of the male silkworm*. *Chem Senses*, 2003. **28**(2): p. 113-30.

49. Seki, Y., H. Aonuma, and R. Kanzaki, *Pheromone processing center in the protocerebrum of Bombyx mori revealed by nitric oxide-induced anti-cGMP immunocytochemistry*. J Comp Neurol, 2005. **481**(4): p. 340-51.
50. Jefferis, G.S., et al., *Comprehensive maps of Drosophila higher olfactory centers: spatially segregated fruit and pheromone representation*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1187-203.
51. Anton, S. and U. Homberg, *Antennal lobe structure*, in *Insect olfaction*, B.S. Hansson, Editor. 1999, Springer, Berlin. p. 97-124.
52. Sadek, M.M., et al., *Glomerular representation of plant volatiles and sex pheromone components in the antennal lobe of the female Spodoptera littoralis*. J Exp Biol, 2002. **205**(Pt 10): p. 1363-76.
53. Hansson, B.S., T.A. Christensen, and J.G. Hildebrand, *Functionally distinct subdivisions of the macroglomerular complex in the antennal lobe of the male sphinx moth Manduca sexta*. J. comp. Neurol., 1991. **312**: p. 264-278.
54. Koontz, M. and D. Schneider, *Sexual dimorphism in neuronal projections from the antennae of silkworms (Bombyx mori, Antheraea polyphemus) and the gipsy moth (Lymantria dispar)*. Cell Tissue Res, 1987. **249**: p. 39-50.
55. Hallem, E.A. and J.R. Carlson, *The odor coding system of Drosophila*. Trends Genet, 2004. **20**(9): p. 453-9.
56. Vogt, R.G. and L.M. Riddiford, *Pheromone binding and inactivation by moth antennae*. Nature, 1981. **293**: p. 161-163.
57. Bohbot, J., et al., *Functional characterization of a new class of odorant-binding proteins in the moth Mamestra brassicae*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(2): p. 489-94.
58. Lartigue, A., et al., *X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32094-8.
59. Zhou, J.J., et al., *Genome and EST analyses and expression of a gene family with putative functions in insect chemoreception*. Chem Senses, 2006. **31**(5): p. 453-65.
60. Gong, D.P., et al., *Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, Bombyx mori*. Insect Biochem Mol Biol, 2007. **37**(3): p. 266-77.
61. Wanner, K.W., et al., *Analysis of the insect os-d-like gene family*. J Chem Ecol, 2004. **30**(5): p. 889-911.
62. Nagnan-Le Meillour, P. and E. Jacquin-Joly, *Biochemistry and diversity of insect odorant-binding proteins*. Insect Pheromone Biochemistry and Molecular Biology, 2003: p. 509-538.
63. Klein, U., *Sensillum-lymph proteins from antennal olfactory hairs of the moth Antheraea polyphemus (Saturniidae)*. Insect Biochem., 1987. **17**(8): p. 1193-1204.
64. Vogt, R.G., G.D. Prestwich, and M.R. Lerner, *Odorant-binding-protein subfamilies associate with distinct classes of olfactory receptor neurons in insects*. J. Neurobiol., 1991. **22**(1): p. 74-84.
65. Vogt, R.G. and M.R. Lerner, *Two groups of odorant binding proteins in insects suggest specific and general olfactory pathways*. Neurosci. Abst, 1989. **15**: p. 1290.
66. Krieger, J., et al., *Binding proteins from the antennae of Bombyx mori*. Insect Biochem Mol Biol, 1996. **26**(3): p. 297-307.
67. Tegoni, M., V. Campanacci, and C. Cambillau, *Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects*. Trends Biochem. Sci., 2004. **29**(5): p. 257-264.
68. Steinbrecht, R.A., M. Ozaki, and G. Ziegelberger, *Immunocytochemical localization of pheromone-binding protein in moth antennae*. Cell Tissue Res., 1992. **270**: p. 287-302.
69. Steinbrecht, R.A., M. Laue, and G. Ziegelberger, *Immunolocalization of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths Antheraea and Bombyx*. Cell Tissue Res., 1995. **282**: p. 203-217.
70. Wojtasek, H. and W.S. Leal, *Conformational change in the pheromone-binding protein from Bombyx mori induced by pH and by interaction with membranes*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 30950-6.
71. Grosse-Wilde, E., A. Svatos, and J. Krieger, *A Pheromone-Binding Protein Mediates the Bombykol-Induced Activation of a Pheromone Receptor In Vitro*. Chem Senses, 2006.

72. Pophof, B., *Pheromone-binding proteins contribute to the activation of olfactory receptor neurons in the silkworms *Antheraea polyphemus* and *Bombyx mori**. *Chem. Senses*, 2004. **29**(2): p. 117-25.
73. Syed, Z., et al., *Pheromone reception in fruit flies expressing a moth's odorant receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(44): p. 16538-43.
74. Sandler, B.H., et al., *Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein-bombykol complex*. *Chem Biol*, 2000. **7**(2): p. 143-51.
75. Horst, R., et al., *NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(25): p. 14374-9.
76. Lee, D., et al., *NMR structure of the unliganded *Bombyx mori* pheromone-binding protein at physiological pH*. *FEBS Lett*, 2002. **531**(2): p. 314-8.
77. Leal, W.S., et al., *Kinetics and molecular properties of pheromone binding and release*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005. **102**(15): p. 5386-5391.
78. Maida, R., et al., *Three pheromone-binding proteins in olfactory sensilla of the two silkworm species *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi**. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(10): p. 2899-908.
79. Gyorgyi, T.K., A.J. Roby-Shemkovitz, and M.R. Lerner, *Characterization and cDNA cloning of the pheromone-binding protein from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: a tissue-specific developmentally regulated protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(24): p. 9851-5.
80. Robertson, H.M., et al., *Diversity of odourant binding proteins revealed by an expressed sequence tag project on male *Manduca sexta* moth antennae*. *Insect. Mol. Biol.*, 1999. **8**: p. 501-518.
81. Maibeche-Coisne, M., et al., *Molecular cloning of two pheromone binding proteins in the cabbage armyworm *Mamestra brassicae**. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1998. **28**: p. 815-818.
82. Krieger, J., et al., *Odorant binding proteins of *Heliothis virescens**. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 1993. **23**(4): p. 449-456.
83. de Santis, F., et al., *Molecular cloning and in Situ expression patterns of two new pheromone-binding proteins from the corn stemborer *Sesamia nonagrioides**. *J Chem Ecol*, 2006. **32**(8): p. 1703-17.
84. Maida, R., G. Ziegelberger, and K.E. Kaissling, *Ligand binding to six recombinant pheromone-binding proteins of *Antheraea polyphemus* and *Antheraea pernyi**. *J Comp Physiol [B]*, 2003. **173**(7): p. 565-73.
85. Du, G. and G.D. Prestwich, *Protein structure encodes the ligand binding specificity in pheromone binding proteins*. *Biochemistry*, 1995. **34**: p. 8726-8732.
86. Vogt, R.G., et al., *Expression of pheromone binding proteins during antennal development in the gypsy moth *Lymantria dispar**. *J. Neurosci.*, 1989. **9**(9): p. 3332-3346.
87. Grater, F., et al., *Pheromone discrimination by the pheromone-binding protein of *Bombyx mori**. *Structure*, 2006. **14**(10): p. 1577-86.
88. Ziegelberger, G., *Redox-shift of the pheromone-binding protein in the silkworm *Antheraea polyphemus**. *Eur. J. Biochem.*, 1995. **232**: p. 706-711.
89. Kaissling, K.-E., *Olfactory perireceptor and receptor events in moths: a kinetic model*. *Chem. Senses*, 2001. **26**: p. 125-150.
90. Dahanukar, A., E.A. Hallem, and J.R. Carlson, *Insect chemoreception*. *Curr Opin Neurobiol*, 2005. **15**(4): p. 423-30.
91. Hallem, E.A. and J.R. Carlson, *Coding of odors by a receptor repertoire*. *Cell*, 2006. **125**(1): p. 143-60.
92. Buck, L. and R. Axel, *A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition*. *Cell*, 1991. **65**: p. 175-187.
93. Nakagawa, T., et al., *Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors*. *Science*, 2005. **307**(5715): p. 1638-1642.
94. Clyne, P.J., et al., *A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila**. *Neuron*, 1999. **22**(2): p. 327-38.
95. Gao, Q. and A. Chess, *Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence*. *Genomics*, 1999. **60**(1): p. 31-39.

96. Vosshall, L.B., et al., *A spatial map of olfactory receptor expression in the Drosophila antenna*. Cell, 1999. **96**(5): p. 725-736.
97. Fox, A.N., et al., *Candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito Anopheles gambiae and evidence of down-regulation in response to blood feeding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14693-7.
98. Fox, A.N., R.J. Pitts, and L.J. Zwiebel, *A cluster of candidate odorant receptors from the malaria vector mosquito, Anopheles gambiae*. Chem Senses, 2002. **27**(5): p. 453-9.
99. Xia, Y. and L.J. Zwiebel, *Identification and characterization of an odorant receptor from the West Nile virus mosquito, Culex quinquefasciatus*. Insect Biochem Mol Biol, 2006. **36**(3): p. 169-76.
100. Krieger, J., et al., *A divergent gene family encoding candidate olfactory receptors of the moth Heliothis virescens*. Eur J Neurosci, 2002. **16**(4): p. 619-28.
101. Sakurai, T., et al., *Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm Bombyx mori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004. **101**(47): p. 16653-16658.
102. Wanner, K.W., et al., *Female-biased expression of odourant receptor genes in the adult antennae of the silkworm, Bombyx mori*. Insect Mol Biol, 2007. **16**(1): p. 107-19.
103. Whitfield, C.W., et al., *Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behaviour in the honey bee*. Genome Res, 2002. **12**: p. 555-566.
104. Larsson, M.C., et al., *Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for Drosophila olfaction*. Neuron, 2004. **43**(5): p. 703-714.
105. Krieger, J., et al., *A candidate olfactory receptor subtype highly conserved across different insect orders*. J. Comp. Physiol. A, 2003. **189**(7): p. 519-526.
106. Neuhaus, E.M., et al., *Odorant receptor heterodimerization in the olfactory system of Drosophila melanogaster*. Nat. Neurosci., 2005. **8**(1): p. 15-17.
107. Couto, A., M. Alenius, and B.J. Dickson, *Molecular, anatomical, and functional organization of the Drosophila olfactory system*. Curr Biol, 2005. **15**(17): p. 1535-47.
108. Goldman, A.L., et al., *Coexpression of two functional odor receptors in one neuron*. Neuron, 2005. **45**(5): p. 661-666.
109. Gao, Q., B. Yuan, and A. Chess, *Convergent projections of Drosophila olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe*. Nat. Neurosci., 2000. **3**(8): p. 780-785.
110. Vosshall, L.B., A.M. Wong, and R. Axel, *An olfactory sensory map in the fly brain*. Cell, 2000. **102**(2): p. 147-59.
111. Hallem, E.A., M.G. Ho, and J.R. Carlson, *The molecular basis of odor coding in the Drosophila antenna*. Cell, 2004. **117**(7): p. 965-79.
112. Benton, R., *On the ORigin of smell: odorant receptors in insects*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(14): p. 1579-85.
113. Benton, R., et al., *Atypical membrane topology and heteromeric function of Drosophila odorant receptors in vivo*. PLoS Biol, 2006. **4**(2): p. e20.
114. Bray, S. and H. Amrein, *A putative Drosophila pheromone receptor expressed in male-specific taste neurons is required for efficient courtship*. Neuron, 2003. **39**(6): p. 1019-1029.
115. Clyne, P.J., C.G. Warr, and J.R. Carlson, *Candidate taste receptors in Drosophila*. Science, 2000. **287**: p. 1830-1834.
116. Ha, T.S. and D.P. Smith, *A pheromone receptor mediates 11-cis-vaccenyl acetate-induced responses in Drosophila*. J Neurosci, 2006. **26**(34): p. 8727-33.
117. Krieger, J., et al., *Genes encoding candidate pheromone receptors in a moth (Heliothis virescens)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004. **101**(32): p. 11845-11850.
118. Rogers, M.E., et al., *Snmp-1, a novel membrane protein of olfactory neurons of the silk moth Antheraea polyphemus with homology to the CD36 family of membrane proteins*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 14792-9.
119. Rogers, M.E., R.A. Steinbrecht, and R.G. Vogt, *Expression of SNMP-1 in olfactory neurons and sensilla of male and female antennae of the silkworm Antheraea polyphemus*. Cell. Tissue Res., 2001. **303**(3): p. 433-46.
120. Rogers, M.E., J. Krieger, and R.G. Vogt, *Antennal SNMPs (sensory neuron membrane proteins) of Lepidoptera define a unique family of invertebrate CD36-like proteins*. J Neurobiol, 2001. **49**(1): p. 47-61.

121. Ge, Y. and M.T. Elghetany, *CD36: a multiligand molecule*. Lab Hematol, 2005. **11**(1): p. 31-7.
122. Tanoue, S. and T. Nishioka, *A receptor-type guanylyl cyclase expression is regulated under circadian clock in peripheral tissues of the silk moth. Light-induced shifting of the expression rhythm and correlation with eclosion*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 46765-9.
123. Hart, K. and M. Wilcox, *A Drosophila gene encoding an epithelial membrane protein with homology to CD36/LIMP II*. J Mol Biol, 1993. **234**(1): p. 249-53.
124. Franc, N.C., et al., *Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila*. Science, 1999. **284**(5422): p. 1991-4.
125. Kiefer, C., et al., *A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10581-6.
126. Benton, R., K.S. Vannice, and L.B. Vosshall, *An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in Drosophila*. Nature, 2007.
127. Kasang, G., *bombykol reception and metabolism on the antennae of the silmoth Bombyx mori*, in *Gustation and olfaction*, G. Ohloff and A.F. Thomas, Editors. 1971, Academic Press, London. p. 245-250.
128. Ferkovich, S.M., M.S. Mayer, and R.R. Rutter, *Conversion of the sex pheromone of the cabbage looper*. Nature, 1973. **242**: p. 53-55.
129. Ferkovich, S.M., M.S. Mayer, and R.R. Rutter, *Sex pheromone of the cabbage looper: reactions with antennal proteins in vitro*. J. Insect Physiol., 1973. **19**: p. 2231-2243.
130. Vogt, R.G., L.M. Riddiford, and G.D. Prestwich, *Kinetic properties of a pheromone degrading enzyme: the sensillar esterase of Antheraea polyphemus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985. **82**: p. 8827-8831.
131. Rybczynski, R., J. Reagan, and M.R. Lerner, *A pheromone-degrading aldehyde oxidase in the antennae of the moth Manduca sexta*. J Neurosci, 1989. **9**(4): p. 1341-53.
132. Rybczynski, R., R. Vogt, and M. Lerner, *Antennal-specific pheromone-degrading aldehyde-oxidases from the moths Antheraea polyphemus and Bombyx mori*. J. Biol. Chem., 1990. **265**: p. 19712-19715.
133. Kasang, G., M. Nicholls, and P. von, L., *Sex pheromone conversion and degradation in antennae of the silkmoth Bombyx mori L.* Experientia, 1989. **45**: p. 81-87.
134. Prestwich, G.D., et al., *Enzymatic processing of pheromones and pheromone analogs*. Experientia, 1989. **45**: p. 263-270.
135. Ishida, Y. and W.S. Leal, *Rapid inactivation of a moth pheromone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 14075-9.
136. Ishida, Y. and W.S. Leal, *Cloning of putative odorant-degrading enzyme and integumental esterase cDNAs from the wild silkmoth, Antheraea polyphemus*. Insect Biochem Mol Biol, 2002. **32**(12): p. 1775-80.
137. Maïbeche-Coisné, M., et al., *Putative odorant-degrading esterase cDNA from the moth Mamestra brassicae: cloning and expression patterns in male and female antennae*. Chem. Senses, 2004. **29**(5): p. 381-390.
138. Merlin, C., et al., *Antennal esterase cDNAs from two pest moths, Spodoptera littoralis and Sesamia nonagrioides, potentially involved in odourant degradation*. Insect Mol Biol, 2007. **16**(1): p. 73-81.
139. Maïbeche-Coisné, M., et al., *P450 and P450 reductase cDNAs from the moth Mamestra brassicae: cloning and expression patterns in male antennae*. Gene, 2005. **346**: p. 195-203.
140. Merlin, C., et al., *A new aldehyde oxidase selectively expressed in chemosensory organs of insects*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **332**(1): p. 4-10.
141. Rogers, M.E., M.K. Jani, and R.G. Vogt, *An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth Manduca sexta*. J Exp Biol, 1999. **202**(Pt 12): p. 1625-37.
142. Maïbeche-Coisné, M., et al., *Pheromone anosmia in a scarab beetle induced by in vivo inhibition of a pheromone-degrading enzyme*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004. **101**(31): p. 11459-11464.
143. Wojtasek, H. and W.S. Leal, *Degradation of an alkaloid pheromone from the pale-brown chafer, Phyllopertha diversa (Coleoptera: Scarabaeidae), by an insect olfactory cytochrome P450*. FEBS Lett, 1999. **458**(3): p. 333-6.

144. Malnic, B., et al., *Combinatorial receptor codes for odors*. Cell, 1999. **96**(5): p. 713-23.
145. Touhara, K., et al., *Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 4040-5.
146. Mombaerts, P., et al., *Visualizing an olfactory sensory map*. Cell, 1996. **87**(4): p. 675-86.
147. Godfrey, P.A., B. Malnic, and L.B. Buck, *The mouse olfactory receptor gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 2156-61.
148. Malnic, B., P.A. Godfrey, and L.B. Buck, *The human olfactory receptor gene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2584-9.
149. Robertson, H.M. and K.W. Wanner, *The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family*. Genome Res, 2006. **16**(11): p. 1395-403.
150. Lucas, P. and M. Renou, *Responses to pheromone compounds in *Mamestra suasa* (Lepidoptera: Noctuidae) olfactory neurones*. J. Insect Physiol., 1989. **35**(11): p. 837-845.
151. Boeckh, J., K.E. Kaissling, and D. Schneider, *Insect olfactory receptors*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1965. **30**: p. 263-280.
152. Rogers, M.E., R.A. Steinbrecht, and R.G. Vogt, *Expression of SNMP-1 in olfactory neurons and sensilla of male and female antennae of the silkworm *Antheraea polyphemus**. Cell Tissue Res, 2001. **303**(3): p. 433-46.
153. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
154. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei, *MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment*. Brief Bioinform, 2004. **5**(2): p. 150-63.
155. Pelletier, J., et al., *Identification of candidate aldehyde oxidases from the silkworm *Bombyx mori* potentially involved in antennal pheromone degradation*. Gene, 2007. **404**(1-2): p. 31-40.
156. Jacquin-Joly, E., et al., *Characterization of the general odorant-binding protein 2 in the molecular coding of odorants in *Mamestra brassicae**. Eur J Biochem, 2000. **267**(22): p. 6708-14.
157. Horst, R., et al., *NMR assignment of the A form of the pheromone-binding protein of *Bombyx mori**. J Biomol NMR, 2001. **19**(1): p. 79-80.
158. Pearlman, D.A., et al., *AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules*. Comp. Phys. Commun, 1995. **91**: p. 1-41.
159. Bash, P.A., et al., *Calculation of the relative change in binding free energy of a protein-inhibitor complex*. Science, 1987. **235**(4788): p. 574-6.
160. Simonson, T., G. Archontis, and M. Karplus, *Free energy simulations come of age: protein-ligand recognition*. Acc Chem Res, 2002. **35**(6): p. 430-7.
161. Raming, K., J. Krieger, and H. Breer, *Primary structure of a pheromone-binding protein from *Antheraea pernyi*: homologies with other ligand-carrying proteins*. J. comp. Physiol., 1990. **160**: p. 503-509.
162. Krieger, J., K. Raming, and H. Breer, *Cloning of genomic and complementary DNA encoding insect pheromone binding proteins: evidence for microdiversity*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1088**(2): p. 277-84.
163. Plettner, E., et al., *Discrimination of pheromone enantiomers by two pheromone binding proteins from the gypsy moth *Lymantria dispar**. Biochemistry, 2000. **39**(30): p. 8953-8962.
164. Prestwich, G.D., G. Du, and S. LaForest, *How is pheromone specificity encoded in proteins?* Chem. Senses, 1995. **20**: p. 461-469.
165. Campanacci, V., et al., *Revisiting the specificity of *Mamestra brassicae* and *Antheraea polyphemus* pheromone-binding proteins with a fluorescence binding assay*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(23): p. 20078-20084.
166. Maida, R., et al., *The pheromone binding protein of *Bombyx mori*: purification, characterization and immunocytochemical localization*. Insect Biochem. Mol. Biol., 1993. **23**(2): p. 243-253.
167. Maida, R., T. Proebstl, and M. Laue, *Heterogeneity of odorant-binding proteins in the antennae of *Bombyx mori**. Chem. Senses, 1997. **22**: p. 503-515.

168. Vogt, R.G., et al., *A comparative study of odorant binding protein genes: differential expression of the PBP1-GOBP2 gene cluster in Manduca sexta (Lepidoptera) and the organization of OBP genes in Drosophila melanogaster (Diptera)*. J Exp Biol, 2002. **205**(Pt 6): p. 719-44.
169. Forstner, M., et al., *Candidate pheromone binding proteins of the silkworm Bombyx mori*. Invert Neurosci, 2006. **6**(4): p. 177-87.
170. Ljungberg, H., P. Anderson, and B.S. Hansson, *Physiology and morphology of pheromone-specific sensilla on the antennae of male and female Spodoptera littoralis (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Insect Physiol., 1993. **39**(3): p. 253-260.
171. Kalinova, B., et al., *Detection of sex pheromone components in Manduca sexta (L.)*. Chem. Senses, 2001. **26**(9): p. 1175-1186.
172. Kent, K.S. and L.M. Griffin, *Sensory organs of the thoracic legs of the moth Manduca sexta*. Cell Tissue Res, 1990. **259**(2): p. 209-23.
173. Consoulas, C., *Remodeling of the leg sensory system during metamorphosis of the hawkmoth, Manduca sexta*. J Comp Neurol, 2000. **419**(2): p. 154-74.
174. Maher, N. and D. Thiery, *A bioassay to evaluate the activity of chemical stimuli from grape berries on the oviposition of Lobesia botrana (Lepidoptera: Tortricidae)*. Bull Entomol Res, 2004. **94**(1): p. 27-33.
175. Vosshall, L.B. and R.F. Stocker, *Molecular architecture of smell and taste in Drosophila*. Annu Rev Neurosci, 2007. **30**: p. 505-533.
176. Hallem, E.A., A. Dahanukar, and J.R. Carlson, *Insect odor and taste receptors*. Annu Rev Entomol, 2006. **51**: p. 113-35.
177. Calvello, M., et al., *Expression of odorant-binding proteins and chemosensory proteins in some Hymenoptera*. Insect Biochem Mol Biol, 2005. **35**(4): p. 297-307.
178. Jornvall, H., et al., *Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)*. Biochemistry, 1995. **34**(18): p. 6003-13.
179. Danielsson, O., et al., *Fundamental molecular differences between alcohol dehydrogenase classes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4980-4.
180. Smilda, T., et al., *Enzymic and structural studies on Drosophila alcohol dehydrogenase and other short-chain dehydrogenases/reductases*. J Mol Evol, 2001. **52**(5): p. 457-66.
181. Terao, M., et al., *Avian and canine aldehyde oxidases. Novel insights into the biology and evolution of molybdo-flavoenzymes*. J Biol Chem, 2006. **281**(28): p. 19748-61.
182. Abbot, A., *Biologists claim Nobel prize with a knock-out*. Nature, 2007. **449**: p. 642.
183. Wang, H.G. and M.J. Fraser, *TTAA serves as the target site for TFP3 lepidopteran transposon insertions in both nuclear polyhedrosis virus and Trichoplusia ni genomes*. Insect Mol Biol, 1993. **1**(3): p. 109-16.
184. Lucas, P. and P. Nagnan-Le Meillour, *Primary culture of antennal cells of Mamestra brassicae: morphology of cell types and evidence for biosynthesis of pheromone-binding proteins in vitro*. Cell Tissue Res., 1997. **289**(2): p. 375-382.
185. Nagai, T., et al., *Electroantennogram responses of the european corn borer, Ostrinia nubilalis, to (Z)- and (E)-11-tetradecenyl acetates*. J. Insect Physiol., 1977. **23**: p. 591-597.

Résumé / Abstract

La communication phéromonale chez les lépidoptères, si sensible et spécifique, constitue un modèle de choix pour l'étude des bases moléculaires de la réception olfactive. La spécificité de ce système serait assurée dès le niveau périphérique, dans l'antenne, par l'intervention d'une diversité de protéines impliquées dans la chimioréception des odorants. Le ver à soie, *Bombyx mori*, est une espèce particulièrement appréciée pour l'étude des mécanismes olfactifs : la réponse des mâles à la phéromone est connue, l'espèce est manipulable génétiquement et les séquences génomiques sont accessibles sur Internet.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu identifier et caractériser au niveau moléculaire une diversité de gènes olfactifs appartenant à différentes familles par des techniques bioinformatiques d'analyse du génome et de biologie moléculaire. Leurs patrons d'expression ont notamment été analysés afin de vérifier si leur localisation tissulaire était compatible avec une fonction chimiosensorielle. Certains de ces gènes (*BmPBP2*, *BmPBP3*, *BmAox2*) pourraient coder pour des protéines spécifiquement impliquées dans la réception phéromonale alors que d'autres (*BmAox1*, *BmSNMP2*) pourraient intervenir aussi dans la réception de molécules moins spécifiques. Par leurs interactions combinées et séquentielles avec les molécules odorantes, ces différentes familles de protéines permettraient d'assurer leur reconnaissance spécifique au cours des différentes étapes périphériques de la réception olfactive.

Par ailleurs, j'ai pu participer à la mise au point chez le ver à soie d'un outil novateur d'analyse fonctionnelle *in vivo* basé sur l'expression par transgénèse de RO dans les antennes du ver à soie. Ce système a été développé avec un récepteur phéromonal mâle-spécifique, *BmOR1*. Les femelles des lignées transgéniques exprimaient fortement le récepteur dans leurs antennes, mais se sont révélées incapables de répondre au composé phéromonal (Bol) au cours d'enregistrements électrophysiologiques. L'utilisation future d'un nouveau promoteur spécifique des neurones olfactifs, *pOR2*, pourrait permettre de développer le premier système stable d'analyse fonctionnelle *in vivo* chez un lépidoptère.

Mots clés: communication phéromonale, réception olfactive périphérique, *Bombyx mori*, génome, transgénèse, outils d'analyse moléculaire.

Lepidoptera's pheromonal communication, so sensitive and specific, constitutes a model of choice to study the molecular basis of olfactory reception. The strong specificity of this system is thought to be ensured in the antennae by the intervention of a diversity of genes implicated in the olfactory chemoreception. The silkworm, Bombyx mori, is a particularly interesting species for studying olfaction in insects: male's response to the pheromone is well known, this species is amenable to genetic manipulations and genomic sequences are available on the Internet.

In my PhD work, I have identified and characterized at the molecular level a diversity of olfactory genes by bioinformatic analysis of the genome and molecular biology tools. The expression patterns of these genes have been established in order to check for a possible chemosensory function. Some of them (BmPBP2, BmPBP3, BmAox2) could encode proteins specifically involved in pheromonal reception whereas others (BmAox1, BmSNMP2) could also act in the reception of less specific molecules. By their combinatorial and sequential actions in signal recognition, these proteins from different families would ensure specific recognition across the different steps of peripheral olfactory reception.

I have also participated in the development of a new in vivo functional analysis tool in B. mori, based on the expression of OR by transgenesis. This system has been tested with a male-specific pheromone receptor, BmOR1. Females from transgenic lines strongly expressed the receptor in their antennae, but were unable to respond to the pheromonal compound (Bol) during electrophysiological recordings. Future use of a new promotor, more specific to olfactory neurons, pOR2, could allow the development of the first stable in vivo functional analysis tool in a lepidoptera.

Keywords: *pheromonal communication, peripheral olfactory reception, Bombyx mori, genome, transgenesis, molecular biology tools.*