

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTE – LILLE-NORD DE FRANCE

THESE

présentée et soutenue à huis-clos par

CHRYSTELLE LE DANVIC

Pour l'obtention du grade de

Docteur de L'Université Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Biologie des populations

DETECTION DE L'ŒSTRUS CHEZ LES BOVINS

Co-Directeurs de thèse

Dr. P. Nagnan-Le Meillour - Dr. P. Humblot

Soutenue le 30 Septembre 2009 devant le jury composé de :

Dr. J-C Michalski, DR INSERM
Dr. G. Ganem, CR CNRS
Dr. P.Chemineau, DR INRA
Dr. P. Nagnan - Le Meillour, DR INRA
Dr. P. Humblot, DS UNCEIA
Dr. A-G Bagnères, DR CNRS
Dr. D. Legrand, CR CNRS

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

L'œstrus (ou chaleurs) est une période critique dans la mise en place des processus de reproduction au sein des élevages, notamment dans le cadre d'une reproduction par insémination artificielle. D'une détection précise de l'œstrus dépend un bon rendement de reproduction. Or, les techniques de détection actuelles s'avèrent lourdes à mettre en place, onéreuses et n'assurent pas une détection systématique de l'œstrus. L'objectif de ce travail est de **chercher des méthodes nouvelles** de détection de l'œstrus basées sur les **processus olfactifs de reconnaissance des chaleurs par le mâle**, par l'intermédiaire de signaux chimiques émis dans les urines de femelle. La connaissance de l'identité chimique de ces signaux, ainsi que de leurs protéines de liaison dans les tissus olfactifs devrait permettre le **développement d'un biosenseur** sur lequel seraient greffées les protéines de liaison, permettant de détecter de façon automatique et précise les composés volatils émis par les femelles en œstrus. La mise au point d'un tel biosenseur nécessite une étude approfondie des interactions entre protéine et signal chimique. Afin de mettre en évidence les signaux chimiques de l'œstrus chez les bovins (*Bos Taurus*), des urines de vaches (30) ont été collectées à différents stades de leur cycle œstral. Après extraction par phase organique, la composition chimique de ces urines a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La comparaison des profils chimiques urinaires au cours de cycle œstral a permis l'identification d'une série de composés présents de façon spécifique aux stades pré-œstrus et/ou œstrus chez certains animaux. Une **grande variabilité interindividuelle** et entre les collectes a été observée. Des tests comportementaux sont en cours afin de valider l'activité biologique des composés identifiés et de confirmer leur implication dans la détection de l'œstrus par le mâle. Aucune protéine impliquée dans la liaison des composés œstrus-spécifiques identifiés n'a pu être mise en évidence dans les urines des femelles émettrices. La sérumalbumine, décrite chez l'éléphant comme liant la phéromone sexuelle femelle, a été retrouvée dans les urines. Chez l'animal détecteur, plusieurs isoformes de la **protéine bovine de liaison aux odeurs (OBPb)** ont pu être mises en évidence dans les tissus olfactifs. Des analyses bioinformatiques ont permis de définir des sites potentiels de phosphorylation et de glycosylation sur l'OBPb. Les études biochimiques réalisées ont confirmé la phosphorylation d'un des variants de l'OBPb et la présence d'une chaîne N-glycannique sur la partie N-terminale de la protéine. L'existence d'une diversité d'OBPb suggère une spécificité de liaison de chaque isoforme vis-à-vis des ligands odorants. Leur propriété de liaison a été quantifiée par spectroscopie de fluorescence, ouvrant ainsi la voie à des études de relations structure-fonction de ces OBP.

Abstract

Estrus (or heat) detection is the critical stage in livestock reproduction. Efficiency of artificial insemination, the major method of reproduction used in cattle, depends on the accurate detection of this short female stage. Currently used detection methods are quite expensive and insecure. This work aims to the elucidation of chemical communication involved in estrus detection by the male. Indeed, male can detect heats by **olfactory cues emitted in urine of female**. Identification of such chemical cues and their associated binding proteins in estrus behaviour will permit to develop **new biotechnological tools as biosensors** for estrus detection. To characterize estrus specific molecules, urine from 30 cows was collected at specific stages of the estrus cycle and their chemical composition has been assayed by GC/MS analysis. No systematic estrus specific compounds have been characterized, but we were able to characterize a few compounds as pre-estrus and/or estrus specific in some animals. Identified compounds remain to be tested for their biological activity and ability to elicit sexual behaviour in order to confirm their real implication in estrus detection. No protein binding these molecules could be identified in urine. The **urinary serum albumin**, described in female elephant urine as a pheromone carrier protein, was characterized. The study of protein in the olfactory area led us to identify several isoforms of **bovine Odorant Binding Protein (bOBP)**, in male and female olfactory tissues. Isoforms can be distinguished by their post-translational modifications. Our biochemical experiments showed phosphorylation on one bOBP variant and a N-glycan is present at the N-terminus of the protein. Existence of various bOBP isoforms suggests function specificity, in particular in their binding properties. Spectroscopic fluorescence experiments were performed to analyze the structure-function relationships between the various bOBP isoforms and odorant molecules to ascertain this hypothesis.

Je tiens à exprimer ma gratitude à :

Monsieur le Professeur Jean-Claude Michalski qui m'a accueilli au sein de son unité et qui me fait le plaisir de présider le jury de cette thèse,

Madame le Docteur Guilla Ganem et Monsieur le Docteur Philippe Chemineau qui m'ont fait l'honneur de juger ce mémoire,

Madame le Docteur Anne-Geneviève Bagnères et Monsieur le Docteur Dominique Legrand pour avoir accepté le rôle d'examineur.

Je remercie Mr. Maurice Barbeuzant pour m'avoir accueilli dans son entreprise et pour son soutien au projet PHEROESTRUS.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Patricia Nagnan-Le Meillour qui m'a promptement accueillie dans son groupe. Merci d'avoir encadré mon apprentissage scientifique, de m'avoir conseillé et de m'avoir offert de multiples opportunités d'enrichissements tant scientifiques que personnels.

Je remercie aussi le Docteur Patrice Humblot pour son soutien permanent au projet et son suivi au cours de mes trois années de thèse.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des personnes qui a contribué aux travaux présentés dans ce manuscrit au sein de l'UGSF : à Mlle Fanny Brimau pour son aide précieuse durant ma fin de thèse, à Mr. Jean-Paul Cornard, pour sa patience et son initiation à la spectroscopie de fluorescence, à Mr. Yves Leroy, pour m'avoir permis d'appréhender la GC/MS et de m'avoir appris à dompter le « spectro », et surtout de sa confiance à toute épreuve, à Mme Bernadette Coddeville pour m'avoir initié et fait profiter de ses connaissances sur la technique du BiaCore, à Mlle Adeline Page pour son initiation à la spectrométrie de masse MALDI-TOF et ses chaleureux conseils.

Mes pensées vont également au personnel de l'UNCEIA qui m'a chaleureusement accueilli au sein de leur entreprise, avec une pensée particulière aux personnes de la station expérimentale de Châteauvillain : Catherine Joly, Sylvianne Ponchon, Cyril Gonzalez. Merci Cyril pour les petites nuits que nous avons partagées dans le froid de la stabule ... Merci à Florian pour sa bonne humeur permanente ... (même et surtout à 5 heures du matin) !!!

Un grand merci à toutes les personnes de l'INRA de Nouzilly qui ont participé aux collectes (d'urines mais aussi de tissus) et aux tests comportementaux : Christine Briant, Monique Ottogalli, Sumant Vyas, l'équipe d'animalier de la PRC. Une pensée particulière pour Francis Dupont qui m'a accompagné au cours de la deuxième collecte réalisée à Châteauvillain qui a partagé avec moi un séjour dans le froid de l'Isère ... et ceci toujours dans la bonne humeur.

Je n'oublie pas toutes les personnes du « C9 » que j'ai pu croiser (et un peu plus) tout au long de mes quatre années passées dans l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle.

Parce que sans les bons passés avec vous, ma vie dans le Nord n'aurait pas été aussi si heureuse ... Une pensée pour la presque Japonaise maintenant ... qui a partagé et bien souvent subit mes humeurs ... Une énorme pensée pour Gaby, l'amie de tous les combats ... Merci les garçons !!! Hervé pour nos chamailleries et un peu plus, Alain et David pour votre

écoute, Nico pour la personne que tu es ... Un grand merci à Emilie pour son caractère enjoué et volontaire qui depuis la Bretagne a toujours été là ...

Enfin, mes pensées vont bien évidemment à ma famille qui m'a soutenu sans condition tout au long de ses dernières années (comme toujours). Merci pour votre présence malgré les kilomètres qui nous séparaient, merci pour votre écoute et votre attention ... et je sais que ce n'est pas évident ...

Table des Matières

Préambule ix
Liste des abréviations xi

Introduction Générale

Introduction 1
I - Emission du signal 2
 I-1 - Le stimulus chimique : les médiateurs chimiques ou sémiochimiques..... 2
 I-1-1 - Classification et caractéristiques 2
 I-1-2 - Nature des médiateurs chimiques 5
 I-1-3 - Lieux de production et d'émission 5
 I-2 - Les protéines de transport..... 6
II - Réception et transduction du signal olfactif..... 7
 II-1 - Les organes détecteurs chez les Mammifères 7
 II-1-1 - Les muqueuses respiratoires et olfactives 8
 II-1-2 - L'organe voméronasal 8
 II-2 - Les récepteurs olfactifs 9
 II-2-1 - Les récepteurs de la muqueuse olfactive..... 9
 II-2-2 - Les récepteurs de la muqueuse voméronasale 10
 II-3 - Transduction du signal olfactif et événements périrécepteurs 10

Chapitre A

Caractérisation des médiateurs chimiques impliqués dans la détection de l'oestrus dans l'urine et les mucus vaginaux chez les bovins d'élevage

Introduction	13
Résultats	18
A-I - Essais préliminaires - Standardisation des protocoles	20
A-I-1 - Analyses des urines	21
A-I-1-1 - Extraction des urines par SPME	21
A-I-1-2 - Extraction des urines par DCM	22
A-I-2 - Analyse des mucus vaginaux	24
A-I-2-1 - Extraction des mucus vaginaux par SPME	24
A-I-2-2 - Extraction des mucus vaginaux par DCM	24
A-I-3 - Conclusion	25
A-II - Etude de la variabilité de la composition chimique des urines et des mucus vaginaux chez des vaches superovulées ou non - « Collectes de Châteauvillain »	25
A-II-1 - Etude de la variabilité de la composition chimique des urines au cours du cycle oestral	25
A-II-1-1 - Etude de la variabilité de la composition chimique des urines au cours du cycle oestral chez des vaches superovulées - « Châteauvillain 1 »	25
A-II-1-2 - Etude de la variabilité de la composition chimique des urines au cours du cycle oestral chez des vaches non superovulées - « Châteauvillain 2 » (Octobre 2007).....	27
A-II-1-3 - Etude de la variabilité de la composition chimique des urines au cours du cycle oestral chez des vaches non superovulées - « Châteauvillain 3 » (Mai 2007)	28
A-II-2 - Etude de la variabilité de la composition chimique des mucus vaginaux au cours du cycle oestral lors des collectes réalisées à la station expérimentale de Châteauvillain	28
A-II-2-1 - Analyse comparée des mucus vaginaux des vaches superovulées de la collecte « Châteauvillain 1 »	29
A-II-2-1 - Analyse comparée des mucus vaginaux des vaches superovulées de la collecte « Châteauvillain 1 »	29

A-II-3 - Hétérogénéité des variations chimiques des urines des vaches collectées à la station expérimentale de Châteauvillain	29
A-III - Etude comparative des profils urinaires de génisses au cours d'un cycle oestral (collecte "Nouzilly 3")	31
Discussion	32

Chapitre B

Caractérisation des protéines des liaisons

Introduction	37
Résultats	40
B-I - Caractérisation des protéines contenues dans les tissus olfactifs (MR, VNO et MN)	40
B-I-1 - Séparation des protéines par SDS-PAGE	40
B-I-2 - Séparation des protéines par PAGE	43
B-I-3 - Purification des protéines des tissus olfactifs par chromatographie échangeuse d'anions	44
B-I-4 - Localisation de l'OBPb par détection immunologique	45
B-I-4-1 - Production d'anticorps polyclonaux anti-OBPb	45
B-I-4-2 - Analyse des tissus et fluides du système olfactif	46
B-I-4-2-1 - Western-blot après SDS-PAGE	46
B-I-4-2-2 - Western-blot après PAGE	47
B-I-5 - Caractérisation des différentes isoformes de l'OBPb	49
B-I-5-1 - Recherche de variants nucléotidiques	49
B-I-5-2 - Recherche de modification post-traductionnelles pour l'OBPb	50
B-I-5-2-1 - Analyse <i>in silico</i>	50
B-I-5-2-2 - Etude de la phosphorylation de l'OBPb	54
B-I-5-2-3 - Etude de la glycosylation de l'OBPb	53

B-II - Recherche de protéines de liaison dans les urines et les mucus cervicaux de vache	55
B-II-1 - Recherche de l'OBP bovine.....	55
B-II-2 - Recherche de l'albumine	56
B-II-3 - Extraction des ligands intrinsèques de l'albumine et de l'OBPb	56
Discussion	57

Partie C

Etudes des relations structures fonction OBP/ligands odorants

Introduction	61
Résultats	64
C-I - Production des OBP porcines et bovines en système hétérologue <i>Pichia pastoris</i>	64
C-I-1 - Expression des variants juvénile et adulte recombinants de l'OBP porcine (OBPp)	64
C-I-1-1 - Production d'OBPa et d'OBPj recombinantes	65
C-I-1-2 - Mise en évidence d'isoformes phosphorylées de l'OBPp.....	65
C-I-2 - Expression de l'OBPb et de son mutant de glycosylation recombinants en système <i>P. pastoris</i>	66
C-I-2-1 - Production des OBPb recombinantes	66
C-I-2-2 - Purification des OBPb recombinantes.....	68
C-II - Etude des interactions OBP/ligands odorants par résonance plasmonique de Surface (RPS)	69
C-II-1 - Immobilisation des protéines sur sensor chip	69
C-II-1-1 - Le sensor chip CM5	69
C-II-1-2 - Le sensor chip SA	69
C-II-1-3 - Le sensor chip AU	70
C-II-2 - Etude des interactions entre les OBP porcines recombinantes et les ligands odorants.....	70

C-II-2-1 - Etude des interactions sur Sensor chip SA	71
C-II-2-2 - Etude des interactions sur Sensor chip AU	72
C-III - Etude des propriétés fonctionnelles de l'OBPb native et des OBPb recombinantes par spectroscopie de fluorescence	73
C-III-1 - Tests de fixation de l'AMA pour les différents variants de l'OBPb	74
C-III-2 - Déplacement de sondes fluorescentes	75
Discussion	77
Discussion générale - Perspectives	81

Matériels et Méthodes

I - Echantillons biologiques	86
I-1 - Collecte des échantillons biologiques chez l'animal émetteur (urines et mucus vaginaux)	86
I-1-1 - Collectes réalisées sur des vaches réformées de race Prim'holstein (Nouzilly, INRA de Tours)	86
I-1-2 - Collectes réalisées sur des vaches du programme GENANIMAL (Châteauvillain, UNCEIA)	86
I-1-3 - Collectes réalisées sur des génisses (Nouzilly, INRA de Tours)	87
I-2 - Collectes des échantillons biologiques chez l'animal récepteur	88
II - Analyses de la composition chimique des fluides biologiques échantillonnés	88
II-1 - Extraction par SPME en mode « espace de tête »	89
II-2 - Extraction par solvant organique	89
II-3 - Identification des composés chimiques par GC/MS	90
III - Préparation et séparation des protéines	90
III-1 - Extraction des protéines à partir des tissus et fluides biologiques	90
III-2 - Dosage des protéines	91
III-3 - Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide	91
III-4 - Purification des protéines par chromatographie échangeuse d'anions	92

IV - Identification des protéines	92
IV-1 - Cartographie peptidique	92
IV-1-1 - Réduction - Alkylation	92
IV-1-2 - Digestion « en gel ».....	93
IV-1-3 - Extraction des peptides.....	93
IV-1-4 - Microdessalage sur ZipTipC18	93
IV-1-5 - Spectrométrie de masse MALDI-TOF	93
IV-1-6 - Recherche dans les banques de données	94
IV-2 - Western-blot	94
IV-2-1 - Production d'anticorps polyclonaux anti-OBP bovine chez le lapin	94
IV-2-2 - Electrotransfert	95
IV-2-3 - Révélation par anticorps	95
V - Etudes des modifications post-traductionnelles	96
V-1 - Analyses bioinformatiques	96
V-2 - Etude de la phosphorylation	96
V-2-1 - Immunodétection avec des anticorps anti-phosphorylation	96
V-2-2 - Localisation des sites de phosphorylation par la méthode du BEMAD	97
V-2-2-1 - Principe	97
V-2-2-2 - BEMAD	97
V-3 - Etude de la glycosylation : Immunodétection par les lectines	97
VI - Isolement de la séquence complète de l'ADN codant l'OBP bovine dans la muqueuse respiratoire	98
VI-1 - Extraction des ARN totaux	98
VI-2 - Synthèse et amplification de l'ADN complémentaire (ADNc) de l'OBPb	98
VI-3 - Clonage de l'ADNc de l'OBPb	99
VI-3-1 - Ligation et transformation bactérienne.....	99
VI-3-2 - PCR sur colonies	99

VI-3-3 - Extraction des ADN plasmidiques et vérification des inserts	99
VI-4 - 5' RACE-PCR	100
VII - Expression des protéines recombinantes en système hétérologue <i>Pichia pastoris</i>.....	100
VII-1 - Principe	100
VII-2 - Préparation des vecteurs d'expression	101
VII-2-1 - Préparation du vecteur d'expression <i>pPIC3.5K-OBPb</i>	101
VII-2-1-1 - Amplification de l'insert codant l'OBPb	101
VII-2-1-2 - Clonage de l'insert dans le vecteur <i>pPIC3.5K</i>	101
VII-2-2 - Préparation du vecteur d'expression mutant <i>pPIC3.5K-bOBPN9A</i> par mutagenèse dirigée	102
VII-2-2-1 - Principe de la mutagenèse dirigée à l'aide du kit « QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis » (Stratagène)	102
VII-2-2-2 - Mutagenèse	103
VII-2-2-3 - Transformation des bactéries XL10-GOLD	103
VII-3 - Transformation des cellules GS115 <i>P. pastoris</i>	103
VII-3-1 - Principe	103
VII-3-2 - Linéarisation des plasmides	104
VII-3-3 - Préparation des cellules GS115 <i>P. pastoris</i>	104
VII-3-4 - Electroporation	104
VII-4 - Sélections des cellules GS115 transformées	105
VII-5 - Mise en collection	105
VII-6 - Production des OBP recombinantes	106
VII-7 - Purification des OBP recombinantes par chromatographie échangeuse d'anions	106
VIII - Etude des propriétés de liaison des différentes isoformes d'OBPb	107
VIII-1 - Le BIAcore®	107
VIII-1-1 - Principe	107
VIII-1-2 - Immobilisation de l'OBPp sur les sensor chips et analyse des interactions	107

VIII-1-2-1 - Le sensor chip « CM5 »	108
VIII-1-2-2 - Le sensor chip « SA »	108
VIII-1-2-3 - Le sensor chip « AU »	108
VIII-1-3 - Analyse des résultats.....	109
VIII-2 - Spectroscopie de fluorescence.....	109
VIII-2-1 - Mesure des affinités de liaison par compétition avec une sonde fluorescente.....	109
VIII-2-2 - Fixation de la sonde AMA	109
VIII-2-3 - Mesure de l’affinité de la protéine pour des ligands	110
IX - Caractérisation des ligands naturels des protéines.....	110
IX-1 - Extraction des ligands naturels	111
IX-2 - Analyse des ligands extraits par GC/MS	111
Annexes	112
Annexe 1 - Suivi des cycles oestriques des vaches de la collecte « Châteaouvillain 1 »	112
Annexe 2 - Suivi des cycles oestriques des vaches de la collecte « Châteaouvillain 2 »	113
Annexe 3 - Suivi des cycles oestriques des vaches de la collecte « Châteaouvillain 3 »	114
Annexe 4 - Cartographie peptidique des fractions purifiées par HPLC d’OBPb à partir des MR mâles et femelles	115
Annexe 5 - Cartographie peptidique des fractions purifiées par HPLC d’OBPb à partir des MR mâles et femelles.....	116
Publications jointes	117
Références bibliographiques	118
Listes des figures	128
Listes des tableaux	132

Préambule

Mes travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre du programme PHEROESTRUS. Ce projet a été initié sous la double impulsion des éleveurs de l'UNCEIA et du département PHASE de l'INRA. Il a pour objectif de renouveler les techniques de détection de l'oestrus (ou chaleurs) chez les mammifères d'élevage, plus particulièrement chez les bovins. L'oestrus est en effet une période critique dans la mise en place des processus de reproduction au sein des élevages. Cette courte période, pouvant s'étendre de 6 à 12 heures, est la seule période du cycle durant laquelle la femelle est réceptive au mâle, et donc fécondable. Une bonne détection de l'oestrus s'avère donc être la pierre angulaire d'une bonne maîtrise de la reproduction dans les élevages, notamment dans le cadre d'une reproduction par insémination artificielle.

Jusqu'à présent, la maîtrise du moment de l'oestrus dans les élevages se fait *via* l'utilisation d'hormones synchronisant le cycle oestral, et sa détection se fait visuellement par l'éleveur ou par l'utilisation de mâles détecteurs. Au-delà de leur coût (transport des mâles détecteurs, main d'œuvre), ces méthodes se révèlent relativement aléatoires. Des dispositifs d'aide à la détection (marqueurs, harnais) ont été expérimentés mais ils n'améliorent pas de façon significative la détection et leur mise en place s'avère lourde et coûteuse. C'est pourquoi une approche nouvelle semble nécessaire afin d'optimiser la détection de l'oestrus et ainsi améliorer les rendements de reproduction dans le cadre de l'insémination artificielle.

La finalité du programme PHEROESTRUS est de mettre au point un biosenseur basé sur les interactions naturelles entre mâle et femelle, lors d'échange de signaux olfactifs spécifiques au cours des chaleurs. En effet, la détection de la femelle par le mâle au travers d'une composante olfactive a été décrite et suggère que le mâle est capable de reconnaître l'odeur d'une femelle en chaleur. L'objectif est donc de greffer sur un support métallique les protéines impliquées dans la détection, et de les exposer aux odeurs volatiles des femelles dans l'élevage. Un tel dispositif implique une connaissance précise, d'une part de la nature chimique des odeurs émises par la femelle, d'autre part des protéines impliquées dans la réception de ces odeurs par le mâle et enfin, des interactions fines entre odeurs et protéines de liaison.

Ce programme a été développé dans le cadre d'un contrat de recherche partenarial entre l'INRA, l'UNCEIA et le CNRS. Mes travaux de thèse ont été financés par une bourse d'étude CIFRE. Ces travaux ont impliqué plusieurs laboratoires :

- Au sein de l'UNCEIA, et sous la direction du Dr. Patrice HUMBLLOT, les équipes « Hormonologie » de Maisons-Alfort (pour les dosages hormonaux) et « Transfert embryonnaire,

sexage et FIV » de la Station Expérimentale de Châteauvillain (pour les collectes d'échantillons), avec qui j'ai réalisé trois collectes d'échantillons biologiques.

- Au sein de l'INRA, et sous la direction du Dr. Philippe CHEMINEAU, les équipes de l' « Unité Expérimentale » et de l' « Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements », en particulier le Dr. Christine BRIANT pour les prélèvements d'échantillons et la validation comportementale de l'effet biologique des urines et de leurs composés volatils. Le résultat des tests comportementaux ne sera pas exposé dans ce mémoire.

- Au sein de l' « Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle » du CNRS et de l'Université Lille1, j'ai réalisé l'ensemble des expérimentations de physico-chimie et de biochimie décrites dans cette thèse, dans l'équipe « Glycobiologie de l'olfaction » sous la direction du Dr. Patricia NAGNAN-LE MEILLOUR.

Mon travail de thèse a consisté, d'une part, à identifier les signaux chimiques émis par la femelle en chaleur (animal émetteur), et d'autre part, à identifier et caractériser les protéines de liaison de ces signaux chez le taureau et la femelle congénère (animal détecteur). Enfin, les interactions biochimiques entre composés odorants et protéines ont été mesurées par des méthodes spectroscopiques.

Dans un premier temps, j'exposerai l'état des connaissances actuelles sur la Communication Chimique chez les Mammifères et son implication dans la mise en place des comportements sexuels (Introduction Générale). Les résultats expérimentaux seront développés au cours de trois chapitres, chacun précédé d'une brève introduction replaçant les travaux réalisés dans le contexte bibliographique.

Le premier chapitre traitera de l'identification des signaux chimiques émis par la vache au moment de l'oestrus, dans l'urine et le mucus vaginal. Je décrirai d'abord le travail de mise au point réalisé pour affiner les méthodes de collecte d'échantillons, mais aussi d'extraction et d'analyse des composés chimiques, qui s'est révélé nécessaire pour la suite des travaux. Puis, les résultats obtenus sur plusieurs lots d'animaux seront présentés.

Le deuxième chapitre exposera l'analyse des protéines des animaux détecteurs, en mettant l'accent sur la protéine majoritaire dans les tissus olfactifs des bovins, l'OBP bovine.

Dans le troisième chapitre, l'étude des propriétés de liaison entre protéines et composés odorants sera développée. Pour rendre la lecture plus fluide, les « Matériels et Méthodes » détaillés ont été placés après les parties « Discussion Générale » et « Publications » et clôtureront donc ce manuscrit.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMA	1-aminoanthracène
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
ARNr	ARN ribosomique
ARNm	ARN messenger
BCA	Acide bicichonique
BEMAD	β -élimination suivie d'une addition de Michael de DTT (<i>β-Elimination followed by a Michael Addition of DTT</i>)
BMGY	Milieu de croissance cellulaire des levures <i>P. pastoris</i>
BMM	Milieu de production des protéines en levure <i>P. pastoris</i>
BSA	Sérum albumine bovine (<i>Bovin Serum Albumine</i>)
CHCl ₃	Chloroforme
DCM	Dichlorométhane
DIG	Digoxygénine
dNTP	Désoxynucléotides
DO	Densité optique
DTT	Dithiothreitol
E2	Oestradiol
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique (<i>Ethylen Diamine Tetra Acetic</i>)
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i>)
KCl	Chlorure de potassium
kDa	kiloDalton
LB	Milieu Luberia Bertani
LBA	Milieu LB avec ampicilline
LBK	Milieu LB avec kanamicine
LH	Hormone Lutéinisante (<i>Luteinazing Hormone</i>)
MALDI-TOF	Ionisation par désorption laser assistée par matrice (<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight</i>)
MD	Milieu dextrose minimal (<i>Minimal Dextrose</i>)
MeOH	Méthanol
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MgSO ₄	Sulfate de magnésium
MM	Milieu méthanol minimal (<i>Minimal Methanol</i>)
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxide de sodium
OBP	Protéine de liaison aux odorants (<i>Odorant Binding Protein</i>)
OBPb	OBP bovine
OBPp	OBP porcine
P4	Progestérone
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PGF ₂ _	Prostaglandine _
PPi	Préparation pour injection

PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RACE	Amplication rapide des extrémités terminales de l'ADNc (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)
RM	Muqueuse respiratoire (<i>Respiratory Mucosa</i>)
Rpm	Rotation par minute (<i>Rotation per minutes</i>)
RT	Transcription inverse (<i>Reverse Transcription</i>)
SDS	dodécylsulfate de sodium (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
SPME	Micro extraction en phase solide (<i>Solid Phase Micro-Extraction</i>)
TAE	Tampon Tris acétate EDTA
TEMED	Tétraméthyl-éthylène-diamine
TFA	Acide trifluoroacétique (<i>Trifluoro acétique acid</i>)
TBS	Tampon Salin Tris (<i>Tris Buffered Salin</i>)
TBS-T	Tampon Salin Tris supplémenté en Tween-20 (<i>Tris Buffered Salin supplemented with Tween 20</i>)
VNO	Organe voméronasal (<i>Vomero Nasal Organ</i>)
YPD	Milieu de culture pour levure après électroporation

Introduction Générale

Introduction générale

Ces travaux s'inscrivent dans le domaine de l'Écologie Chimique, discipline qui a pour objectif d'analyser l'échange de signaux chimiques entre les organismes d'un écosystème (au sens large), entre espèces et au sein d'une même espèce. Ce domaine est par essence pluridisciplinaire, puisque la chimie de synthèse, la physico-chimie, l'écologie, la dynamique des populations, le comportement, la biochimie et la biologie moléculaire sont sollicités pour identifier les médiateurs chimiques et leurs modalités d'émission et de réception. La communication chimique est utilisée par la plupart des organismes animaux et végétaux, les bactéries, les levures et les champignons. Les médiateurs chimiques sont soit synthétisés de façon active par des organes spécialisés (la glande à phéromones des papillons de nuit), soit dérivés d'autres métabolismes (substances secondaires des plantes). Dans tous les cas, ils sont le fruit d'une adaptation à un milieu donné, sous une forte pression de sélection. En effet, les médiateurs chimiques sont impliqués dans la mise en place des grandes fonctions biologiques vitales pour la survie de l'espèce comme la reproduction ou la nutrition, mais aussi l'alarme et la défense. Ces signaux chimiques, de par leur spécificité, contribuent au maintien de l'isolement interspécifique, et sont donc impliqués dans les processus de spéciation. Ils assurent également l'équilibre des populations au sein de l'écosystème, en régulant les relations prédateurs-proie (ou phytophage-plante). Les médiateurs chimiques sont échangés principalement *via* l'olfaction et le goût, ou par voie systémique chez les plantes et les êtres unicellulaires. Fondamentale chez les Invertébrés, en particulier les Insectes, l'importance de la communication chimique décroît chez les organismes qui privilégient d'autres modalités sensorielles, telles que la vue et l'ouïe (oiseaux et mammifères). Son existence chez l'Homme n'est pas avérée ; la perception de médiateurs chimiques impliquant une réaction innée et stéréotypée est peu acceptable par nos sociétés, que les raisons en soient scientifiques ou sociologiques.

Comme tout processus de transfert d'information, la communication chimique chez l'animal implique la mise en présence d'un individu émetteur et d'un individu récepteur du signal, et se caractérise par quatre étapes : **l'émission, la réception et la transduction du signal** induisant **le comportement**. L'animal émetteur produit et sécrète des médiateurs chimiques, détectés et identifiés spécifiquement par l'animal récepteur au niveau d'organes

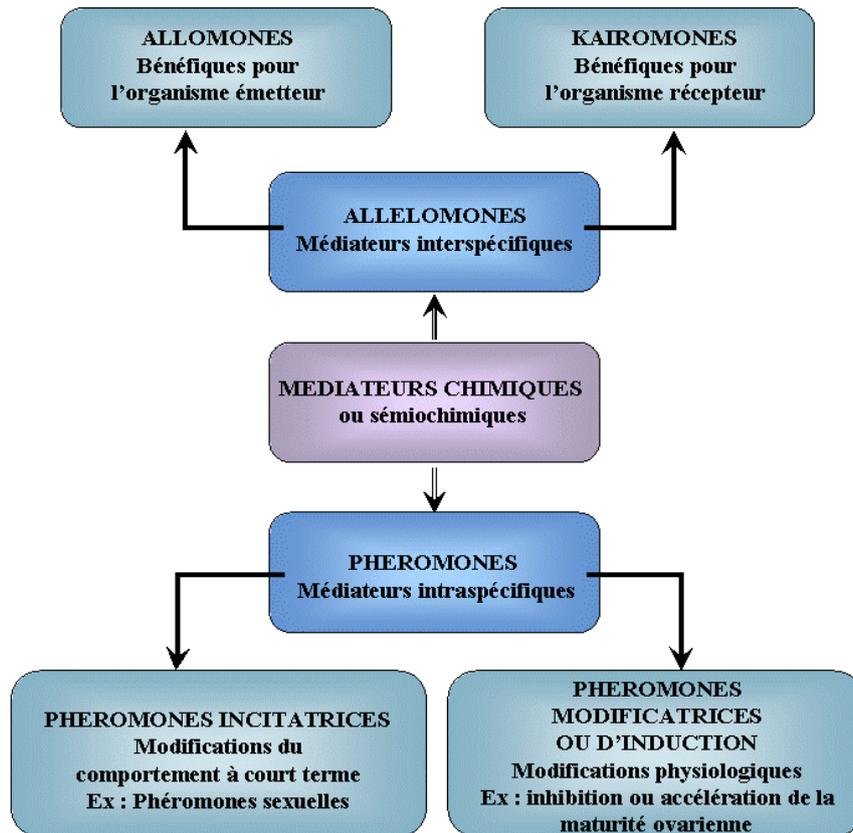


Figure I-1 - Classifications des médiateurs chimiques. Les différents types de médiateurs chimiques impliqués dans la communication chimique inter- et intra-spécifique induisant des modifications de comportement ou de physiologie chez les animaux. D'après R. Brossut « Pheromones – La communication chimique chez les animaux » Edition CNRS Belin, 1996.

sensoriels (la sensille olfactive, le nez, l'organe voméronasal) et de voies nerveuses spécialisées. Les informations reçues sont intégrées au niveau du système nerveux central, ce qui déclenche un comportement ou des modifications physiologiques spécifiques en réponse. La caractéristique principale de la communication chimique est donc sa spécificité, que l'on retrouve à chacune des étapes du système. L'animal récepteur est capable d'extraire du bruit de fond odorant que constitue son environnement, une ou quelques molécules significatives. Cette capacité de discrimination implique un codage très fin au niveau moléculaire qui peut se faire *a priori* à chaque niveau du processus de communication, depuis l'émission du stimulus jusqu'à la mise en place des mécanismes d'intégration. Beaucoup de zones d'ombres restent encore à explorer pour bien comprendre le mode de fonctionnement de la chimioréception, notamment du point de vue moléculaire, avec l'élucidation des étapes initiales de reconnaissance des molécules odorantes par les récepteurs olfactifs (événements périrécepteurs).

I - Emission du signal

I-1 - Le stimulus chimique : les médiateurs chimiques ou sémiouchimiques

I-1-1 - Classification et caractéristiques

Les médiateurs chimiques sont classés en fonction du type de relation dans lequel ils sont impliqués et des effets qu'ils induisent chez les animaux récepteurs. Ainsi, deux grands groupes sont distingués : les **allélomones**, impliquées dans les relations interspécifiques, et les **phéromones**, impliquées dans les relations intraspécifiques (Figure I-1).

Les **allélomones** sont divisées en deux classes de composés : les **allomones** procurent un avantage à l'organisme émetteur (molécules de défense, comme les venins d'Insecte) ; les **kairomones** procurent un avantage à l'organisme récepteur, par exemple les substances secondaires des plantes permettent aux ravageurs des cultures de détecter et de localiser leur nourriture.

Le terme **phéromone**, désignant les médiateurs chimiques impliqués dans la communication entre individus d'une même espèce, dérive du grec « pherein » (transférer) et « hormon » (exciter) et fût proposé par Karlson & Lüscher en 1959 pour désigner « les substances qui, sécrétées par un individu à l'extérieur du corps et captées par un individu de la même espèce, induisent chez lui un comportement spécifique ». Il a été défini deux types de phéromones. Les phéromones dont la perception induit des modifications de la physiologie de l'animal récepteur sont dénommées **modificatrices**, tel l'acide 9-oxo-(E)-2-décénoïque

contenu dans la substance royale produite par la reine des abeilles, qui empêche le développement ovarien des ouvrières (Pain & Barbier, 1960). La perception du second type de phéromones, dites **incitatrices**, induit chez l'animal récepteur un comportement stéréotypé, inné, dont les modalités s'observent chez tous les individus de la même espèce. Ce type de phéromone est impliqué dans de nombreux comportements, tant chez les Invertébrés que chez les Vertébrés. Ainsi, on distingue :

- les phéromones de piste ou d'orientation qui permettent aux individus d'une même colonie de se retrouver (le géraniol et le citral attirent les abeilles butineuses vers la ruche). Elles sont caractéristiques des espèces grégaires ou sociales.

- les phéromones territoriales sont déposées par un animal pour marquer son territoire, principalement lors des périodes de reproduction (jet d'urine chez les cervidés ou les canidés).

- les phéromones d'alarme permettent de signaler un danger aux congénères (glandes métatarsales du chevreuil).

- les phéromones de reconnaissance interindividuelle sont impliquées dans la reconnaissance de l'autre au travers de sa signature chimique. Chez les Insectes sociaux, elle est assurée par les hydrocarbures cuticulaires dont la composition est déterminée à la fois par le patrimoine génétique et par les facteurs environnementaux. Chez les Vertébrés, certaines protéines urinaires, les MUP (Major Urinary Proteins), semblent jouer un rôle dans la reconnaissance interindividuelle en participant à la signature chimique de l'urine des rongeurs. Les phéromones maternelles peuvent être placées dans cette catégorie. Ainsi, la phéromone mammaire de Lapin a été identifiée à partir du lait (2-méthylbut-2-enal), elle permet au lapereau nouveau-né de trouver la mamelle et déclenche le comportement de succion (Schaal *et al.*, 2003). Elle permet la co-adaptation mère-jeune.

- les phéromones sexuelles sont à l'origine de la rencontre des partenaires sexuels et du comportement de cour. Il faut aussi mentionner les phéromones aphrodisiaques, qui sont en général produites par le partenaire qui n'émet pas la phéromone sexuelle et facilitent son acceptation lors de l'accouplement. Chez les papillons de nuit, c'est la femelle qui émet la phéromone pour attirer le mâle mais celui-ci, lorsqu'il arrive à proximité de la femelle, dévagine ses pinceaux androconiaux, libérant une phéromone aphrodisiaque qui immobilise la femelle et lui permet d'accepter l'accouplement. Chez le Porc, l'androsténol et l'androsténone sont décrits comme les composants de la phéromone sexuelle mâle, contenue dans la salive du verrat, mais leur rôle s'apparente plus volontiers à une phéromone aphrodisiaque permettant

l'acceptation de la copulation par la femelle. Chez les Insectes, les phéromones sexuelles ont un rôle primordial dans le maintien de l'isolement interspécifique, car si un même composant majoritaire peut attirer les mâles de plusieurs espèces, certains composants minoritaires sont généralement des antagonistes pour les espèces sympatriques. C'est donc la détection du mélange, et non celle de ses composants isolés qui permet la reconnaissance spécifique de la phéromone. Ainsi, la spécificité du système phéromonal résulte non seulement de la co-évolution du système émetteur et du système récepteur (femelle/mâle dans la plupart des espèces), mais aussi de la co-évolution des espèces sympatriques l'une par rapport à l'autre. On a pu mettre en évidence chez certaines espèces de Lépidoptères nocturnes l'existence de « phérotypes » géographiques dont la composition phéromonale est très proche, mais avec des différences qui suggèrent un début de spéciation, sous des pressions de sélection environnementales différentes.

Enfin, les médiateurs chimiques sont ubiquitaires. D'une part, une même molécule ou un même bouquet phéromonal peut avoir plusieurs fonctions (marquage territorial + reconnaissance interindividuelle + attraction sexuelle) au sein du groupe, en fonction de l'individu récepteur. Ainsi, l'androsténone, composant de la phéromone sexuelle du verrat, est attractive pour les truies en œstrus (Reed *et al.*, 1974), mais a également un effet apaisant pour les porcelets (Mc Glone & Morrow, 1988). Dans ce cas, l'androsténone signale la dominance du mâle et induit la soumission des jeunes au sein du groupe social. Un autre exemple est celui de la 2,5-diméthylpyrazine, contenue dans les urines de souris femelle, qui induit un retard de puberté et un rallongement des cycles œstraux chez ses congénères (Jemiolo & Novotny, 1994 ; Ma *et al.*, 1998) et une diminution du taux de testostérone chez le mâle (Koyama, 2004). D'autre part, une même molécule peut servir de phéromone à des espèces très différentes d'un point de vue phylogénétique. L'exemple le plus connu est celui du (Z)-7-dodecanyl acétate (Z7-12:Ac), composé phéromonal de dizaines d'espèces de Lépidoptères et de l'éléphant d'Asie (*Elephas maximus*).

Chez les Vertébrés, et les Mammifères en particulier, les connaissances sont loin d'être aussi précises que chez les Insectes. De nombreux comportements associés à une perception olfactive sont observés de manière descriptive, qui n'a pas permis d'élucider la nature des médiateurs impliqués et leur rôle précis dans ces comportements. La difficulté principale réside dans le fait que les comportements des Mammifères font intervenir plusieurs modalités sensorielles autres que l'olfaction (ou le goût), comme l'ouïe, la vue ou le toucher, réduisant l'importance de la communication chimique.

I-1-2 - Nature des médiateurs chimiques

La première phéromone décrite est la phéromone sexuelle du papillon de nuit *Bombyx mori*, le bombycol (Butenandt *et al.*, 1961). Depuis, les phéromones de plus d'un millier d'espèces de Lépidoptères (Pherolist : www.nysaes.cornell.edu/pheronet/) et d'autres ordres d'Insectes, principalement Hyménoptères (abeilles, fourmis), Coléoptères, Hémiptères et Isoptères (termites) ont été identifiées (www.pherobase.com). Il est très difficile de décrire de façon exhaustive la nature des médiateurs chimiques, car elle est très variée. Ce sont souvent des produits secondaires issus du métabolisme général, ce qui explique qu'on les retrouve de façon ubiquiste. Chez les organismes aquatiques, les médiateurs chimiques sont des composés hydrosolubles, acides aminés ou dérivés stéroïdiens (Poissons). Chez les organismes adaptés à la vie aérienne, ils sont de nature volatile et hydrophobe, et de faible masse moléculaire (< 400 Da). Une grande hétérogénéité dans leur nature et structure chimique est observée. Il peut en effet s'agir de composés dérivés de la biosynthèse des acides gras (hydrocarbures, acétates, alcools, aldéhydes, cétones, époxydes), de terpènes ou terpénoïdes, de composés aromatiques (benzaldéhyde) ou polycycliques (stéroïdes, alcaloïdes), des indoles, des amines et des acides aminés. L'asymétrie moléculaire est importante sur le plan biologique. L'existence d'isomères, d'énantiomères et de racémiques détermine l'activité et la spécificité des phéromones. Ainsi, le stéréo-isomère d'un composé phéromonal attractif peut être inhibiteur du comportement ou répulsif.

Des peptides ou des protéines peuvent également jouer le rôle de phéromone. Ainsi chez la blatte *Leucophaea maderae*, la protéine Lma-P22 sécrétée par une glande dorsale du mâle attire la femelle (Korchi *et al.*, 1998). L'urine des souris mâles contient des protéines, les MUPs, capable d'accélérer la puberté chez la femelle (Mucinat-Caretta *et al.*, 1995).

I-1-3 - Lieux de production et d'émission

Chez les Insectes comme chez les Mammifères, les médiateurs chimiques sont majoritairement produits par des cellules spécifiques formant des glandes, pourvues ou non de réservoir, spécialisées ou dévolues à plusieurs fonctions. Ils sont soit libérés directement à l'extérieur de l'animal (phéromones sexuelles d'Insecte), soit sécrétés dans des fluides biologiques tels que la salive, l'urine, les sécrétions vaginales, la sueur ou les fèces. Dans ce cas, les médiateurs sont transportés par des protéines de leur lieu de sécrétion jusqu'à leur lieu

d'émission. Chez les Lépidoptères, l'émission de phéromone s'effectue sous contrôle hormonal ou nerveux, grâce à un neuropeptide produit par la chaîne nerveuse, le PBAN (Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide), qui agit sur des récepteurs spécifiques présents sur la membrane de la glande à phéromone. Chez les Mammifères, on constate que l'émission de médiateurs est liée à l'état physiologique des animaux. Ainsi, chez l'éléphant d'Asie, seul le mâle adulte en période de reproduction libère de grandes quantités de frontaline à partir de ses glandes temporales. Les jeunes mâles ne sécrètent pas de phéromone. La sécrétion de frontaline est corrélée à de forts taux de testostérone chez le mâle reproducteur (Rasmussen & Greenwood, 2003). Certains médiateurs chimiques sont directement issus de l'alimentation et produits au niveau de l'intestin, c'est le cas très particulier des Coléoptères.

I-2 - Les protéines de transport

Les médiateurs chimiques sont parfois associés à des protéines sur leur lieu de sécrétion et d'émission, elles permettent leur solubilisation dans le milieu hydrophile des fluides biologiques, peu compatible avec leur caractère généralement hydrophobe. Même les phéromones de Lépidoptères sont liées à des protéines dans la glande à phéromones, les ChemoSensory Proteins (CSP) appartenant à la famille des OBP (Odorant-Binding Protein) d'Insecte (Jacquin-Joly *et al.*, 2001). Chez les Mammifères, les médiateurs chimiques émis dans les fluides biologiques (salive, urine, sécrétions vaginales) sont liés à des protéines appartenant à la famille des lipocalines (Flower *et al.*, 2000). C'est le cas de l'**albumine** qui lie la phéromone Z7-12:Ac dans l'urine d'éléphant femelle (Lazar *et al.*, 2004). Après inhalation de l'urine par le mâle, la phéromone est transportée par une OBP dans sa trompe jusqu'à l'organe voméronasal (Lazar *et al.*, 2002). La **SAL** (Salivary Lipocalin), protéine de la salive porcine, lie les composés de la phéromone sexuelle du mâle, l'androsténol et l'androsténone (Marchese *et al.*, 1998, Loëbel *et al.*, 2000, Spinelli *et al.*, 2002). L'**aphrodisine**, contenue dans les sécrétions vaginales de la femelle de hamster, lie une série de composés (l'hexadécanol, l'octadécanol, le (Z)-9-octadécen-1-ol, le (E)-9-octadécen-1-ol et l'acide hexadécanoïque) (Briand *et al.*, 2004) potentiellement impliqués dans la mise en place d'un comportement copulatoire chez le mâle. L'**OBP porcine** est présente dans les fluides maternels tels que liquide amniotique, lait et colostrum où elle lie les composés de la phéromone apaisante de Porc (Guiraudie-Capraz *et al.*, 2005a).

Les MUPs (Major Urinary Proteins, **MUP**) représentent plus d'1% des protéines urinaires chez les rongeurs. Produites et sécrétées par le foie, les MUPs sont filtrées par les

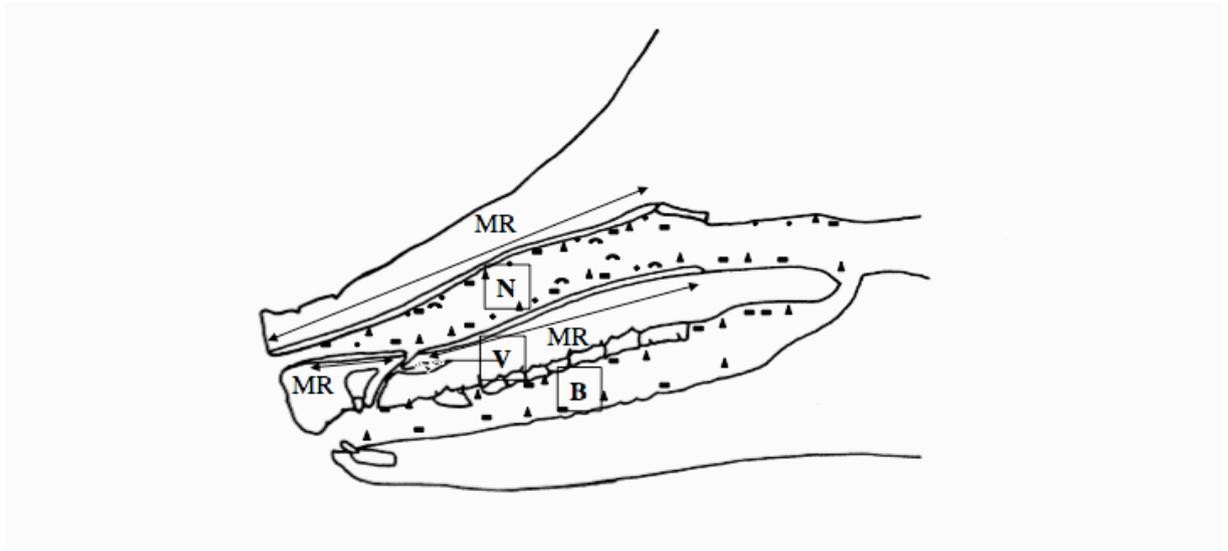


Figure I-2 - Coupe sagittale de tête de Porc. MR : muqueuse respiratoire, V : VNO, N : cavité nasale, B : cavité buccale. D'après Guiraudie, 2003.

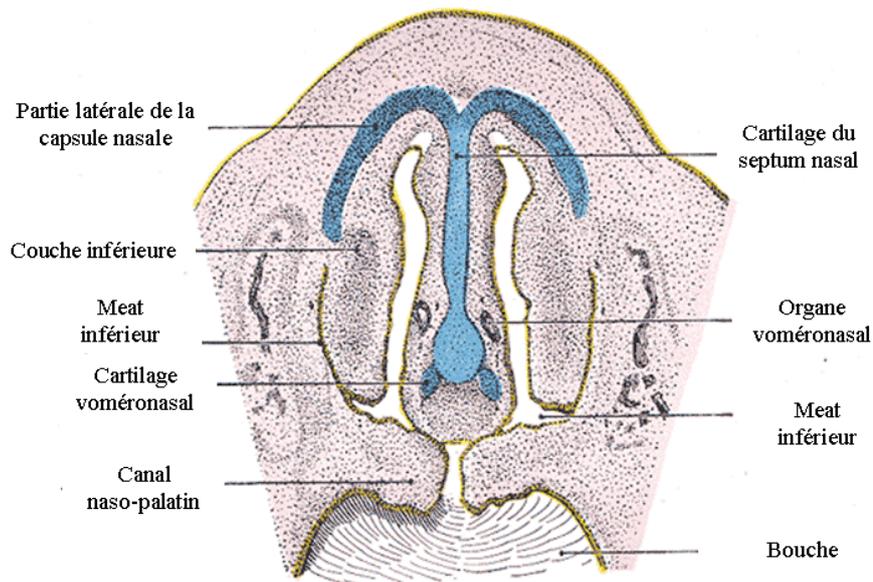


Figure I-3 - Schéma localisant le VNO
D'après Guiraudie, 2003.

glomérules rénaux où elles sont concentrées avant d'être secrétées dans les urines (Cavaggioni & Mucignat-Caretta, 2000). Ces protéines jouent un rôle essentiel dans la communication chimique chez les rongeurs en convoyant de nombreux médiateurs chimiques (Novotny *et al.*, 1999 ; Dulac & Torello, 2003). Les MUPs protègent le signal phéromonal de la dégradation et participent au prolongement temporel du signal en assurant une libération lente de la molécule phéromonale (Hurst *et al.*, 1998). Les MUPs présentent une grande variabilité interindividuelle (Roberston *et al.*, 1996) qui est issue d'un grand polymorphisme génétique. Dans leurs travaux, Hurst et collaborateurs (1998) montrent que les MUPs pourraient être un support de l'identité génétique des souris et donc impliquées dans la reconnaissance interindividuelle (Hurst *et al.*, 2001). La reconnaissance de l'identité d'un individu serait basée sur une « carte d'identité protéique urinaire » (Beynon *et al.*, 2002).

II - Réception et transduction du signal olfactif

Le système olfactif constitue un exemple remarquable de convergence évolutive. Car si les organes détecteurs apparaissent très différents, par exemple chez les Invertébrés et les Mammifères (antenne et nez ou museau), les voies de réception et de transduction sont très similaires. Dans les deux cas, il y existe deux systèmes olfactifs, l'un dédié aux phéromones et l'autre aux odeurs dites « générales », représentées en réalité par toutes les odeurs non-phéromonales. Les phéromones, vitales pour la survie de l'espèce ont donc un système olfactif dédié, qui se caractérise par sa grande sensibilité et spécificité. Chez les Vertébrés, la réception et la détection du signal olfactif sont assurées par deux systèmes olfactifs : le système olfactif principal et le système olfactif accessoire (Figure I-2). Chacun de ces systèmes possède ses propres organes cibles (le nez /museau et l'organe voméronasal) ainsi que ses propres voies neuronales : du niveau périphérique constitué des muqueuses olfactive et voméronasale, qui abritent des récepteurs olfactifs spécifiques, jusqu'aux projections de leurs axones dans respectivement le bulbe olfactif et le bulbe accessoire.

II-1 - Les organes détecteurs chez les Mammifères

Les deux organes participant à la réception et la détection des signaux chémiochimiques sont la muqueuse olfactive (MO), située au fond des fosses nasales, et l'organe voméronasal (VNO, VomeroNasal Organ) ou organe de Jacobson (Takami, 2002), situé au-dessus et en arrière du palais (Figure I-3).

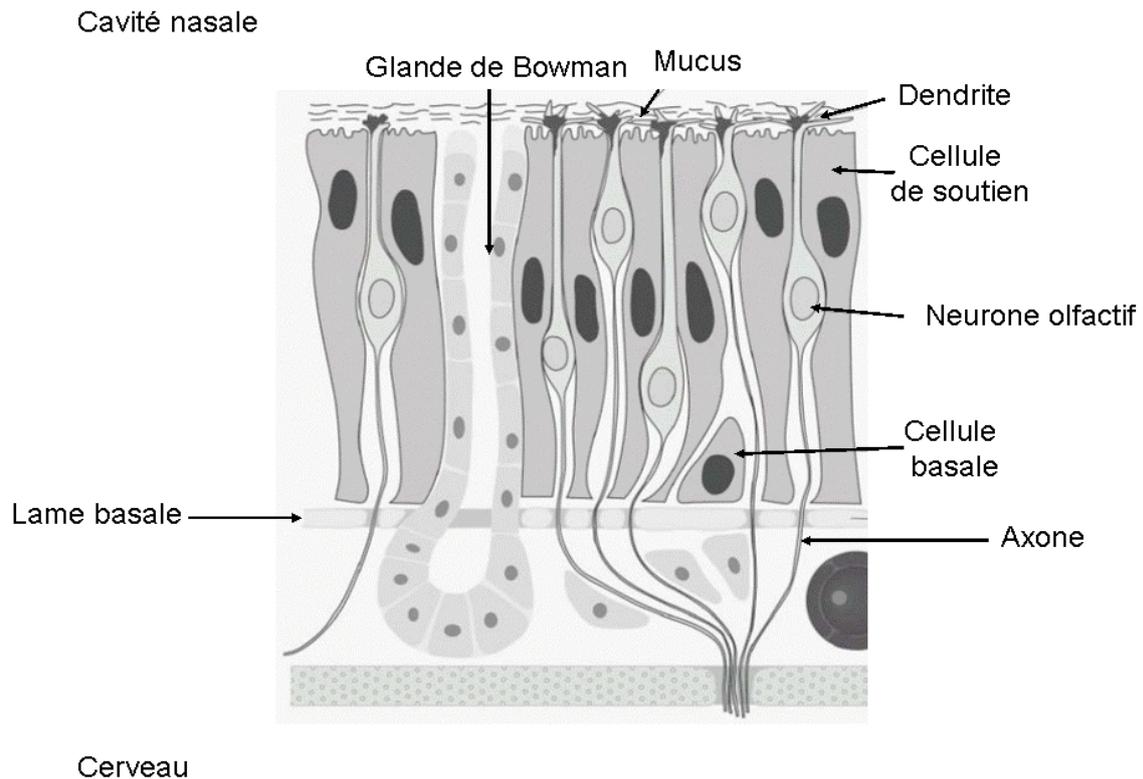


Figure I-4 - Organisation de l'épithélium olfactif (souris). La reconnaissance des molécules odorantes au sein de cet épithélium est effectuée par les neurones olfactifs. L'axone de ces cellules bipolaires traverse la lame basale pour atteindre le centre nerveux primaire qu'est le bulbe olfactif et transmettre le message nerveux, tandis que leurs dendrites baignent dans le mucus de la cavité nasale. Ces neurones sont entourés de cellules basales assurant leur renouvellement, et de cellules de soutien. Les glandes de Bowman assurent le renouvellement du mucus nasal, en particulier des protéines qui le composent, dont les OBP. D'après Tcatchoff, 2007.

II-1-1 - Les muqueuses respiratoires et olfactives

Les parois des fosses nasales, communiquant avec l'extérieur par les narines, sont tapissées de deux muqueuses, la muqueuse respiratoire (MR) et la muqueuse olfactive (MO). La muqueuse respiratoire est un épithélium sécrétoire, tandis que la muqueuse olfactive abrite les neurones olfactifs et leurs prolongements dendritiques qui baignent dans le mucus nasal. La muqueuse respiratoire se compose de cellules épithéliales ciliées et de cellules caliciformes. Les cellules ciliées entraînent le mucus produit par les cellules caliciformes recouvrant la muqueuse respiratoire jusqu'au fond de la cavité nasale où se trouve la MO. Celle-ci tapisse la région dorsale postérieure des fosses nasales, et constitue l'organe principal de l'olfaction chez les Mammifères. De couleur brun-jaunâtre et s'étendant sur une surface de quelques centimètres carrés, cette muqueuse est composée des cellules réceptrices que sont les neurones olfactifs, de cellules de soutien, ainsi que d'une couche de cellules basales (Figure I-4). Les cellules réceptrices ou neurones olfactifs sont intercalés entre les cellules de soutien et les cellules basales. Ces dernières assurent le renouvellement à la fois des cellules de soutien et des neurones olfactifs. En effet, les neurones olfactifs sont des neurones particuliers qui sont renouvelés constamment (Caggiano *et al.*, 1994). De forme bipolaire, les neurones olfactifs présentent des dendrites se terminant par des renflements ciliés qui baignent dans le mucus recouvrant la muqueuse olfactive. Les dendrites sont donc en contact direct et permanent avec les médiateurs chimiques circulant (libres ou liés à des protéines). Les axones de tous les neurones olfactifs convergent pour constituer le nerf olfactif qui se projette dans le premier relais synaptique qu'est le bulbe olfactif.

Le mucus olfactif se présente comme un milieu aqueux qui épouse la forme de l'épithélium olfactif. Les glandes de Bowman, situées dans l'épithélium de la muqueuse respiratoire, sont, entre autres, à l'origine de la sécrétion du mucus et de sa stabilité mécanique (glycoprotéines, olfacoméline). Les fonctions du mucus sont multiples : défense immunitaire (immunoglobulines), détoxification (cytochrome p450), réservoir d'ions nécessaires à la neurogénèse des neurones olfactifs, transport des molécules odorantes, etc...

II-1-2 - L'organe voméronasal

Le VNO (ou organe de Jacobson) est l'organe détecteur du système olfactif accessoire. Localisé entre la cavité nasale et la partie antérieure de la sphère orale, cet organe est relié à la cavité buccale par le canal incisif et à la cavité nasale par le canal nasopalatin (Kerverne,

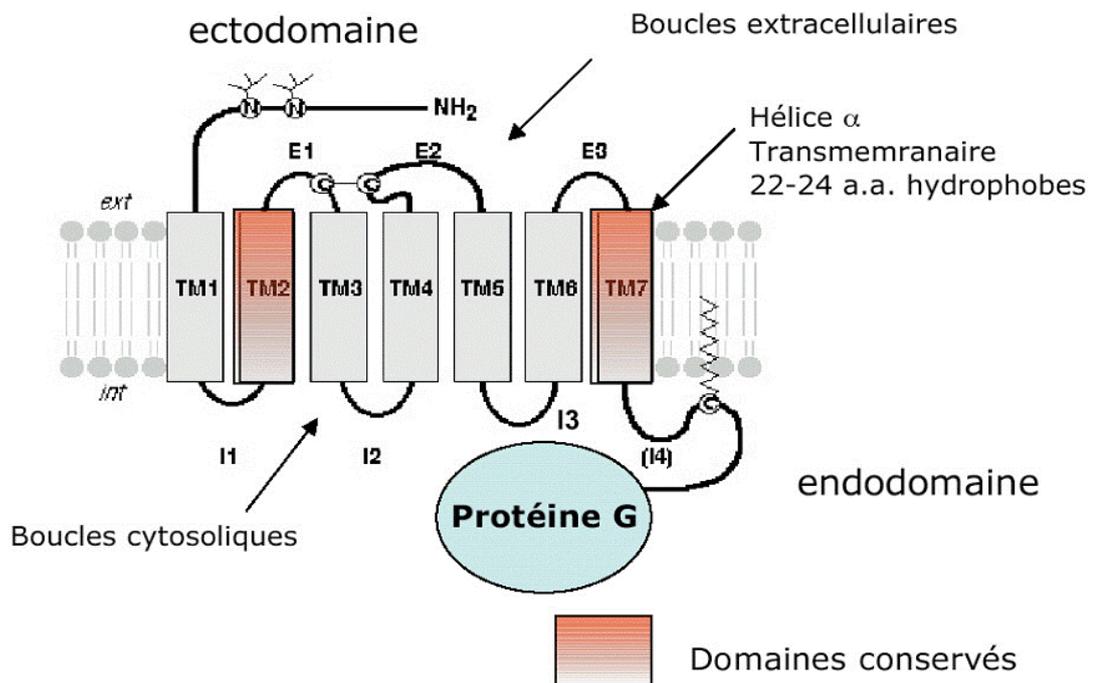


Figure I-5 - Schéma d'un récepteur olfactif.
D'après Tcatchoff, 2007.

1999). Plus ou moins développé selon les espèces, cet organe est bifide, puisqu'après un canal débouchant à la fois sur le canal incisif et le canal nasopalatin, il se sépare en deux cavités cylindriques tapissées par une muqueuse histologiquement analogue à celle de l'épithélium olfactif. Plus précisément, une des faces du cylindre est l'équivalent de la muqueuse respiratoire à activité sécrétoire et l'autre face est l'équivalent de la muqueuse olfactive avec des neurones olfactifs spécifiques du VNO (Mandiyan *et al.*, 2005). Les cils terminaux des dendrites neuronales de la muqueuse olfactive sont ici remplacés par des microvillosités.

L'implication respective des deux systèmes olfactifs dans le codage des composés odorants n'est pas encore complètement connue. Un schéma général du codage olfactif a tout d'abord attribué la détection des phéromones aux neurones olfactifs de l'organe voméronasal, alors que la détection des autres odeurs serait dévolue aux neurones de la muqueuse olfactive principale (Dulac & Torello, 2003 ; Brennan & Keverne, 2004). De plus en plus de travaux démentent cependant cette théorie. Certains comportements médiés par des phéromones persistent après des lésions du VNO (Hudson & Distel, 1986 ; Dories *et al.*, 1997 ; Lévy *et al.*, 2004). De plus, chez la souris, des neurones du VNO sont stimulés par des odeurs non spécifiques, comme des odeurs florales ou de bois (Sam *et al.*, 2001). Le codage des odeurs et des phéromones semble faire intervenir les deux systèmes olfactifs, selon des modalités spatio-temporelles qu'il reste à déterminer.

II-2 - Les récepteurs olfactifs

Que ce soit dans la MO ou dans le VNO, les récepteurs olfactifs sont enchâssés dans la membrane du neurone olfactif baignant dans le mucus, chaque neurone portant des récepteurs spécifiques. Trois familles principales de récepteurs olfactifs ont été identifiées chez les Vertébrés, les récepteurs du système olfactif principal, RO (Buck & Axel, 1991) et les récepteurs du système olfactif accessoire, V1R et V2R. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G_{olf} (Buck & Axel, 1991).

II-2-1 - les récepteurs de la muqueuse olfactive

La muqueuse olfactive possède deux types différents de récepteurs olfactifs. Les RO (Figure I-5), récepteurs principaux, et les récepteurs de type TAARs (Liberles & Buck, 2006). La famille des RO est une large famille car plus de 1300 gènes ont été décrits chez la Souris (Zhang & Firestein, 2002). Ces protéines ont été identifiées pour la première fois en 1991 par

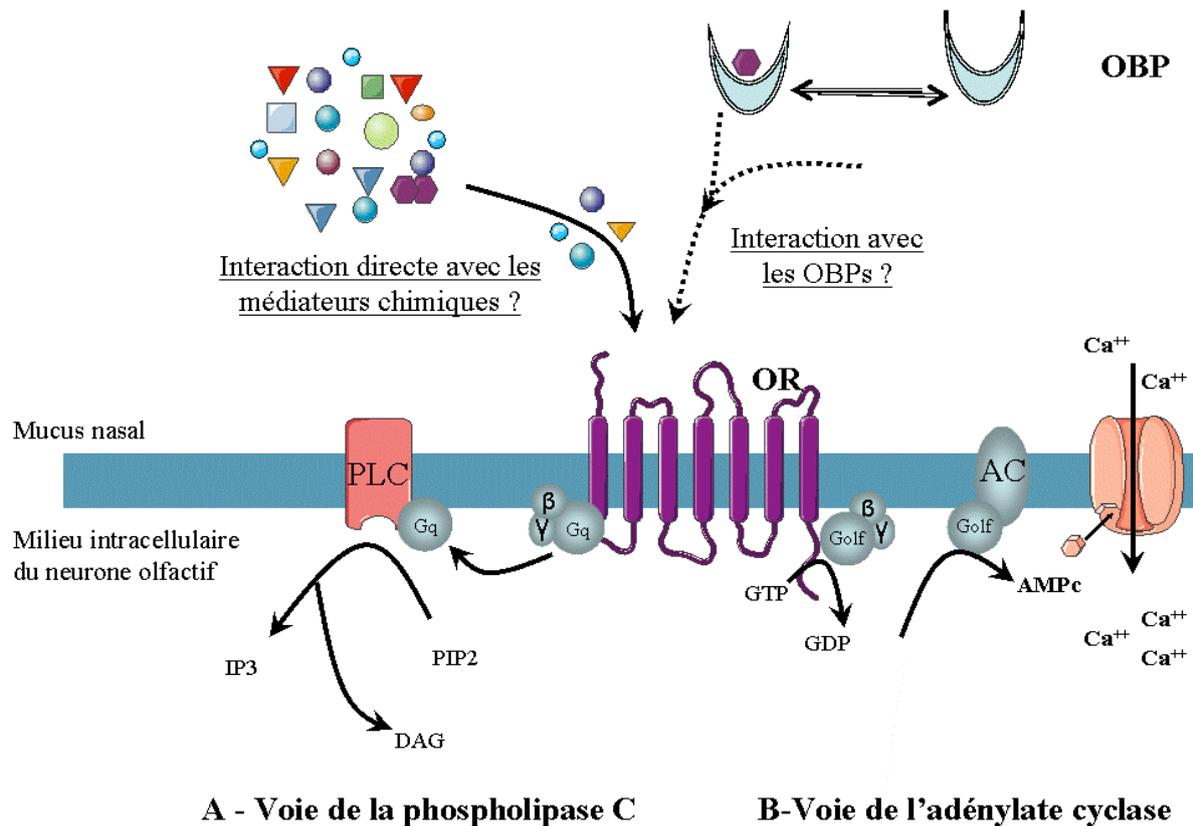


Figure I-6 - Cascades d'événements impliqués dans la transduction du signal olfactif. (A) Voie de la phospholipase C – l'activation des récepteurs de la membrane des neurones olfactifs induit l'activation de la phospholipase C (PLC) via une protéine Gq. La PLC activée dégrade le phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3). L'IP3 permet l'ouverture de canaux calciques du réticulum endoplasmique libérant le Ca²⁺ vers le cytoplasme, créant une dépolarisation de la membrane (B) Voie de l'AMPc – l'activation des récepteurs de la membrane des neurones olfactifs induit l'activation d'une protéine G_{olf} qui active l'adénylate cyclase (AC). Cette enzyme catalyse la cyclisation de l'AMPc qui permet l'ouverture de canaux calciques entraînant l'entrée des ions Ca²⁺ extracellulaires dans le neurone. Cette entrée d'ions Ca²⁺ dépolarise la cellule et aboutit à la dépolarisation de la membrane. D'après Tcatchoff, 2006.

Linda Buck et Richard Axel (Buck & Axel, 1991), ce qui leur valut le prix Nobel de Médecine en 2004. Etant donné leur faible taux d'homologie avec les autres récepteurs couplés aux protéines G, les RO constituent une famille bien individualisée de récepteurs à sept domaines transmembranaires (Axel & Buck, 1991).

II-2-2 - les récepteurs de la muqueuse voméronasale

Les récepteurs du système olfactif accessoire appartiennent à deux grandes familles : les V1R et les V2R, qui se distinguent par leur extrémité N-terminale. En effet, l'extrémité N-terminale des récepteurs de type V2R est beaucoup plus longue que celle des récepteurs de type V1R. Il semblerait que ces deux types de récepteurs interviennent dans la reconnaissance de ligands différents. Cette famille de récepteurs est caractérisée par une grande variabilité des domaines N-terminaux représentant le domaine extracellulaire. Chez le rat et la souris, la famille des V2R comporte environ 100 gènes différents. De plus, des V2R ont été identifiés chez les champignons et chez le poisson rouge. Les vertébrés aquatiques ont un seul type d'épithélium olfactif, responsable de la détection à la fois des odorants et des signaux phéromonaux, en particulier des prostaglandines et des stéroïdes spécifiques induisant la production de sperme.

II-3 - Transduction du signal olfactif et événements périrécepteurs

Lorsqu'un récepteur est activé, on observe l'ouverture de canaux ioniques et ainsi une dépolarisation de la membrane engendrant un potentiel d'action qui donne naissance à l'influx nerveux. La transduction olfactive, transformation d'un signal chimique en signal électrique, commence par l'activation du récepteur sur sa partie extracellulaire suite à son interaction avec un ligand. Si les éléments de la cascade de transduction au niveau intracellulaire sont bien connus (Figure I-6), la nature du ligand du récepteur olfactif est encore sujet à âpre débat. En particulier, le rôle des OBP dans le processus de transduction n'est pas encore élucidé. Ces protéines sont des lipocalines (environ 20 kDa) sécrétées en abondance par les glandes de Bowman dans le mucus nasal. Elles se lient aux composés odorants et phéromonaux, assurant leur solubilisation et leur transport jusqu'aux récepteurs olfactifs (Tegoni *et al.*, 2000). Les OBP préviennent aussi la saturation des récepteurs en diminuant le taux de composés odorants libres à leur voisinage (Pelosi, 2001). En outre, très peu d'OBP différentes ont été identifiées pour une espèce donnée, suggérant une faible spécificité de discrimination des composés odorants. Ainsi, les OBP sont considérées comme des transporteurs passifs des composés odorants, libérant leur ligand sur le récepteur, qui lui est très spécifique. **Dans cette première hypothèse**, les molécules odorantes sont les ligands des

récepteurs olfactifs (Figure I-6). Cette hypothèse a longtemps prévalu, en raison du fait que les récepteurs olfactifs sont stimulés *in vitro* par des molécules odorantes, sans la participation des OBP (Kajiya *et al.*, 2001). Pourtant, des travaux plus récents ont mis en évidence une grande affinité et des interactions spécifiques entre l'OBP porcine et le RO humain OR17-210 exprimé dans des cellules de Mammifère (Matarazzo *et al.*, 2002). Une telle interaction a été observée avec l'OBP libre de tout ligand, suggérant que dans certaines conditions physiologiques, l'OBP peut interagir avec le RO. La même interaction a été mesurée avec l'OBP porcine recombinante (Guiraudie-Capraz *et al.*, 2005b). Des interactions spécifiques ont également été mises en évidence entre l'OBP de rat (OBP-1F) et le RO humain OR17-40 lié à un sensor chip (Vidic *et al.*, 2008). Enfin, l'OBP3 de rat exprimée en cellules de la lignée humaine HEK augmentent la sensibilité de détection des molécules odorantes par le récepteur de rat OR17 (Ko & Park, 2008). L'ensemble de ces données indique que l'OBP pourrait avoir un rôle actif dans la transduction olfactive.

En effet, **une seconde hypothèse** est que les ligands des récepteurs olfactifs seraient les complexes spécifiques formés par la liaison entre OBP et molécules odorantes (Figure I-6). Cette hypothèse implique la nécessité d'un changement de conformation de l'OBP lors de la fixation de la molécule odorante, conférant au complexe une forme « active », susceptible d'interagir avec le domaine extracellulaire du récepteur. La spécificité de liaison de certaines OBP a été démontrée pour une sous-classe particulière, les Pheromone-Binding Proteins (PBP). Les PBP sont sécrétées dans divers fluides biologiques (larmes, salive, urine, mucus vaginal) impliqués dans la communication chimique et sont liés de façon spécifique à des ligands endogènes à action phéromonale :

- les MUPs de souris (Finlayson *et al.*, 1969) contiennent le 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole et la 6-hydroxy-6-méthyl-3-heptanone (Schwende *et al.*, 1986), qui attirent les femelles et sont répulsifs pour les mâles (Mucignat-Caretta *et al.*, 1999). La protéine, avec ou sans ses ligands, accélère la puberté chez les animaux pré-pubères (Vandenbergh, 1969 ; Mucignat-Caretta *et al.*, 1995).

- l'aphrodisine de hamster (Singer *et al.*, 1986 ; Henzel *et al.*, 1988) est libérée avec la décharge vaginale de la femelle lors de la reproduction et induit le comportement de monte du mâle (Singer *et al.*, 1987). Il n'est pas encore démontré si ce rôle biologique est dû à la

protéine elle-même où à ses ligands naturels qui sont des composés volatils (Briand *et al.*, 2004a).

- la SAL porcine est exprimée à la fois dans l'aire nasale et dans la salive où elle contient l'androsténol et l'androsténone, les composés de la phéromone sexuelle du verrat (Marchese *et al.*, 1998). La SAL de l'aire nasale ne contient pas de ligand endogène (Scaloni *et al.*, 2001).

- récemment, nous avons identifié les ligands naturels de la VEG porcine (Von Ebner's Gland Protein) : ils diffèrent fortement selon que la VEG est glycosylée ou non. La VEG glycosylée ne lie que la testostérone, dont le rôle phéromonal n'a pas encore été démontré (Le Danvic *et al.*, 2009). La VEG non glycosylée lie des méthyl esters d'acides gras.

Ces différentes PBP ne se lient qu'avec leurs ligands naturels, de manière spécifique. Dans tous ces cas, la spécificité de liaison peut être reliée à une microhétérogénéité des protéines, qu'elle provienne d'une hétérogénéité génétique (MUP) où d'un polymorphisme lié aux modifications post-traductionnelles (SAL, aphrodisine, VEG). Ces données sont clairement en faveur de l'hypothèse selon laquelle des complexes spécifiques activeraient les récepteurs olfactifs. Il est possible que les deux schémas correspondent à deux modes de codage, le premier au codage des molécules odorantes non phéromonales et le second au codage des composés phéromonaux. Il est dans ce cas possible aussi qu'ils puissent soit coexister dans la même muqueuse, soit avoir lieu, l'un dans la muqueuse olfactive et l'autre dans l'organe voméronasal.

Chapitre A

**Caractérisation des médiateurs chimiques
impliqués dans la détection de l'oestrus dans l'urine
et les mucus vaginaux chez les bovins d'élevage**

La reproduction chez les mammifères met en jeu diverses fonctionnalités sensorielles parmi lesquelles la communication chimique joue un rôle important. L'implication de signaux chimiques mâles (phéromones modificatrices) dans la régulation de **fonctions ovariennes** femelles a été largement documentée chez de nombreuses espèces de mammifères, notamment chez les rongeurs. Par exemple, la 6-hydroxy-6-méthyl-3-heptanone émise dans les urines de la souris mâle induit une accélération de la puberté des jeunes femelles (Novotny *et al.*, 1999). De la même façon, les femelles d'un même groupe influent sur les cycles de leurs congénères en les synchronisant. Des phénomènes semblables sont observés chez les animaux d'élevage telles que la brebis et la chèvre (pour revue Rekwot *et al.*, 2001). Ces propriétés chimiques sont d'ailleurs utilisées en élevage pour manipuler et augmenter les rendements de production chez les animaux ayant une reproduction saisonnée.

La **mise en place du comportement copulatoire** en lui-même fait également intervenir la communication chimique. Chez les mammifères, hormis les primates, l'acte sexuel est restreint à une seule et unique période du cycle de la femelle, l'œstrus. La femelle n'est fécondable et n'accepte l'accouplement avec le mâle qu'au cours de cette courte période. La capacité de reconnaissance de l'œstrus par le mâle est donc essentielle à une bonne reproduction et donc à la survie de l'espèce. Jusqu'à présent, cette reconnaissance *via* des signaux chimiques n'a été étudiée que chez un faible nombre d'espèces (souris, rat, hamster, bovin, éléphant). Des études comportementales ont montré que le mâle était capable de détecter des odeurs femelles et de déterminer le stade du cycle de la femelle chez les rongeurs et chez l'éléphant.

L'observation fine des comportements du mâle face à une femelle en chaleurs a permis de définir une succession d'événements comportementaux mis en place lors du comportement copulatoire, suite à la mise en présence d'urine et de mucus vaginal de femelle en œstrus. **Chez les bovins**, Rivard & Klemm (1989) ont ainsi établi une **séquence sexuelle comportementale** du taureau en réponse au stimulus d'une vache en œstrus, se divisant en trois étapes principales: 1) l'attraction, 2) la détection, se caractérisant par un léchage et un flairage de la zone péri-vaginale et 3) la mise en place du comportement sexuel actif, avec **une érection et la monte de la femelle**.



Figure A-1 - Flehmen observé chez le buffle (*Bubalus bubalis*). Le comportement de flehmen se caractérise par un redressement de la tête et un retroussement de la lèvre supérieure de l'animal. Cette mimique particulière s'accompagne d'inspirations profondes, permettant aux molécules odorantes d'atteindre l'épithélium du VNO, et de léchages avec la langue de la zone renflée (d'après Rajanarayanan & Archunan, 2004).

Au cours de la deuxième étape, un comportement particulier, le flehmen, est observé chez le mâle. Le flehmen correspond à une mimique très caractéristique adoptée par l'animal au cours de laquelle il redresse la tête, et retrousse sa lèvre supérieure (Figure A-1) permettant un accès privilégié des composés odorants aux récepteurs olfactifs du VNO. Cette mimique, décrite chez de nombreux animaux, notamment **chez les félidés et les ongulés**, est généralement observée lorsque l'animal est confronté à un nouvel environnement. Il lui permet de définir son environnement olfactif et n'est pas à proprement dit spécifique du comportement sexuel. Toutefois, une augmentation de la fréquence du flehmen est observée lors de l'examen de la zone péri-vaginale d'une femelle en oestrus par le mâle (Rajanarayanan & Archunan, 2004). La séquence comportementale décrite par Rivard & Klemm (1989) chez *Bos taurus* souligne la part importante de l'olfaction dans la mise en place du comportement sexuel mâle, bien que ne négligeant pas l'importance de la vue et de l'ouïe dans la première étape de détection. Ce n'est toutefois qu'après un « examen » attentif de la zone péri-vaginale de la femelle en œstrus qu'un comportement copulatoire est observé. Cette dernière observation laisse fortement penser à l'implication de médiateurs chimiques contenus dans les fluides se trouvant au niveau de la zone péri-vaginale (urine, mucus vaginal).

La caractérisation **des fluides biologiques porteurs d'informations chimiques spécifiques du stade œstrus** avait été entreprise lors de nombreuses expériences chez les bovins en utilisant des taureaux, des chiens ou des rats dans la détection des chaleurs. Au cours de ces études, différents fluides biologiques (urines, sécrétions vaginales, fèces, sérum, lait) collectés à différents stades du cycle œstral de la vache (pré-œstrus, œstrus, diœstrus) sont présentés aux mâles et leur comportement est observé. Ainsi, il a été montré que des chiens ou des rats conditionnés (entraînés) sont capables de discriminer des urines (Kiddy *et al.*, 1984 ; Dehnhard & Claus, 1988 ; Rameskumar *et al.*, 2008) ou des fèces (Rampin *et al.*, 2006) de vache en fonction de leur stade œstral. L'urine, émise juste avant l'observation des comportements d'oestrus (en pré-oestrus, un jour avant l'oestrus), induit un maximum de réponse comportementale chez le rat mâle, caractérisé par une attention particulière pour les urines de femelles en oestrus et par une érection (Dehnhard *et al.*, 1991). Cette même étude montre que la présence des ovaires semble nécessaire à la mise en place du processus de communication chimique lors de la détection de l'oestrus par le mâle suite au reniflement de l'urine de femelle en oestrus. Le mucus vaginal montre un même profil d'attraction sur les rats en induisant un comportement copulatoire (Klemm *et al.*, 1987). Cette capacité de reconnaissance interspécifique peut au premier abord sembler curieuse dans le cadre de

processus de reproduction qui sont très spécifiques. Mais la reconnaissance des signaux de l'oestrus par des animaux détecteurs entraînés ne s'effectue plus sur la base de processus innés mais sur une discrimination acquise. L'animal conditionné discrimine une composition spécifique ou un composé spécifique ressortant de l'environnement global odorant des fluides présentés. D'autres fluides biologiques tels que la salive, le lait, les sécrétions vaginales, mais aussi les fèces de vache en oestrus semblent être impliqués dans les phénomènes de reconnaissance chimique. La présentation de ces divers fluides au taureau induit chez celui-ci une réaction de flehmen, avec une augmentation notable de sa fréquence lorsqu'ils proviennent d'une vache en œstrus (Sankar & Archunan, 2004) suggérant leur implication dans les phénomènes de détection de la femelle réceptive.

Différents lieux potentiels d'émission de médiateurs chimiques ont pu être identifiés, sans toutefois donner d'indice sur la nature des molécules impliquées. L'urine semble être un fluide biologique privilégié, avec le mucus vaginal, dans la transmission de signaux sexuels femelles au mâle chez les mammifères d'élevage. Chez les bovins, Dehnhard & Claus (1996) ont tenté d'isoler les composés spécifiques de l'oestrus à partir d'urine de vache en oestrus. Après vérification de l'activité inductrice de comportements chez le rat, les urines du stade oestrus ont été extraites *via* différentes techniques. Il en résulte que la(les) molécule(s) active(s) est(sont) de petite(s) taille(s) et relativement polaire(s) (Dehnhard & Claus, 1996). Avec la découverte de la phéromone sexuelle dans l'urine de l'éléphante en oestrus (Rasmussen *et al.*, 1997), un regain d'intérêt a été observé pour **l'identification des phéromones** impliquées dans l'attraction du mâle au moment de l'oestrus par la femelle. L'équipe indienne du Dr. Archunan a entrepris l'identification de telles phéromones chez le rat (*Rattus rattus*), la souris (*Mus musculus*), la vache (*Bos taurus*) et le buffle (*Bubalus bubalis*).

Ainsi **chez les rongeurs**, plusieurs composés attirant le mâle ont été identifiés dans l'urine de femelle en oestrus (rat : Selvaraj & Archunan, 2002 ; souris : Achiraman & Archunan, 2006) mais aussi au niveau de la glande clitoridienne (Kannan & Archunan, 2001) (Figure A-2). **Chez la vache** (race Jersey), cette même équipe a identifié le di-n-propyl phtalate et l'1-iodoundecane comme composés spécifiques du stade œstrus dans les urines (Figure A-2, Kumar *et al.*, 2000) sans toutefois valider leur activité biologique potentielle. Dans les fèces de vache en oestrus, trois composés, l'acide acétique, l'1-iodoundecane et l'acide propionique (Figure A-2) ont été identifiés de façon spécifique de l'oestrus dans les fèces femelle. Leur présentation au taureau, seuls ou en mélange, a montré

Eléphant d'Asie (<i>Elephas maximus</i>)			
Composé identifié	Origine	Activité biologique	Référence
Z7-12 :Ac	Urine	Flehmen	Rasmussen <i>et al.</i> , 1997

Rat (<i>Rattus rattus</i>)			
Composé identifié	Origine	Activité biologique	Référence
Hydroxyperoxyde	Urine	Attraction du mâle	Selvaraj & Archunan, 2002
1-nitropentane			
4-azidoheptane			
6-11-dihydrodibenz-b,e-oxepine-11-one	Glande clitoridienne	Attraction du mâle	Kannan & Archunan, 2001
(Z) 2,6,10-dodecatrien-1-ol, 3,7,11 - triméthyl		Attraction sexuelle chez le mâle et la femelle	
Acide 1,2 benzo-dicarboxylique bis((2-méthyl propyl)ester			

Souris (<i>Mus musculus</i>)			
Composé identifié	Origine	Activité biologique	Référence
1-iodo-2-méthyl undecane	Urine	Attraction du mâle	Achiraman & Archunan, 2006

Buffle (<i>Bubalus bubalis</i>)			
Composé identifié	Origine	Activité biologique	Référence
4-méthyl phénol	Urine	Flehmen	Rajanarayanan, 2004
1-chloro-octane		Erection et monte	
Acide 9-octanoïque			

Vache (<i>Bos taurus</i>)			
Composé identifié	Origine	Activité biologique	Référence
1-iodo-undecane	Urine	Flehmen	Ramesh kumar <i>et al.</i> , 2000 Rameshkumar & Archunan, 2002
Di-n-propyl phtalate			
Triméthyl amine	Salive	Flehmen et monte	Sankar <i>et al.</i> , 2007
Acide acétique			
4-propyl phénol			
Acide pentanoïque			
Acide propionique			
1-iodo-undecane	Fèces	Attraction du mâle	Sankar & Archunan, 2007
Acide acétique		Monte de la femelle	
Acide propionique			

Figure A-2 - Composés spécifiques de l'oestrus identifiés chez les mammifères - L'ensemble des tableaux présentés résume les composés identifiés comme spécifiques de l'oestrus pour différentes espèces de mammifères en précisant leur origine et leur activité biologique, lorsqu'elle a été testée.

leur capacité à prolonger le temps de flehmen et à augmenter le nombre de montes en comparaison avec le témoin négatif, le phénol (Sankar & Archunan, 2007). De même, trois composés spécifiques de la salive de femelle en oestrus, la triméthylamine, l'acide acétique et le 4-propyl phénol (Figure A-2) semblent induire une augmentation de la fréquence des flehmens observés et un comportement de monte chez le mâle, avec une activité induite plus forte de la triméthylamine (Sankar *et al.*, 2004). Dans ses travaux de thèse, S. Rajanarayanan (2004) a identifié le 1-chloro-octane, le 4-méthyl phénol et l'acide octadécénoïque comme les molécules émises spécifiquement au moment de l'oestrus dans les urines de **bufflesse**. Le 4-méthyl phénol semble à lui seul responsable du flehmen (l'acide 9-octadécénoïque et le chloro-1-octane n'induisant ce comportement que lorsqu'ils sont associés au 4-méthyl phénol). L'acide 9-octadécénoïque semble être responsable de la monte de la femelle (Rajanarayanan, 2004).

Les travaux réalisés chez **l'éléphant d'Asie**, *Elephas maximus*, par Bets Rasmussen et ses collaborateurs sont les seuls ayant permis l'identification et la validation d'une phéromone sexuelle femelle. La stratégie employée sur ce Mammifère est la même que celle utilisée depuis des décennies chez l'Insecte : mise en évidence d'un comportement sexuel associé à la perception d'odeurs émises par un congénère, extraction et purification des composés à partir du fluide émetteur, identification des composés par des méthodes physico-chimiques, tests comportementaux avec l'analogue commercial et le composé purifié, étude des voies de biosynthèse et du contrôle hormonal de la production et de l'émission. Dans un premier temps, il a été montré que des composés de l'urine de femelle en œstrus provoquent un flehmen chez le mâle (Rasmussen *et al.*, 1982). La phéromone a été identifiée à partir de l'urine par les techniques classiques appliquées aux insectes : extraction avec des solvants organiques de différentes polarités (jusqu'à l'eau), séparation et identification par GC/MS et RMN. Le composé majoritaire est le Z7-12:Ac, phéromone de nombreux Lépidoptères nocturnes (Rasmussen *et al.*, 1997). L'analogue synthétique, commercial, induit des flehmens chez les mâles captifs, mais également des comportements de cour chez les mâles sauvages. L'utilisation de la technique de SPME (voir Matériels et Méthodes) couplée à la GC/MS a permis de déterminer les modalités de production de la phéromone. La concentration urinaire de Z7-12:Ac est indétectable en phase lutéale (0,48 µg/ml), puis croît jusqu'en phase folliculaire pour atteindre 33 µg/ml juste avant l'ovulation. De plus, cette concentration est sensible au pH et à la chaleur, ainsi qu'au traitement avec des protéases (Rasmussen *et al.*, 2001). Ainsi, une grande partie de la phéromone n'est pas libre dans l'urine, mais liée à

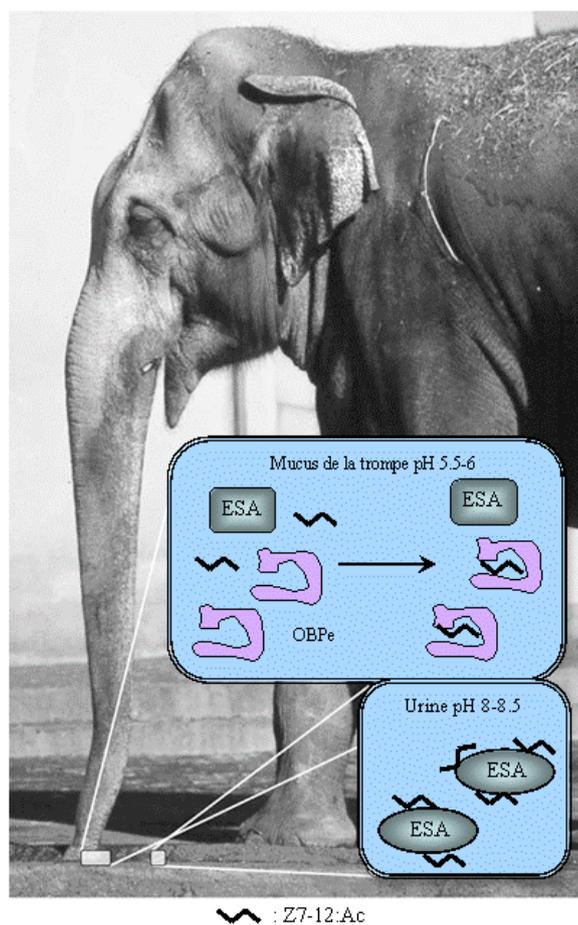
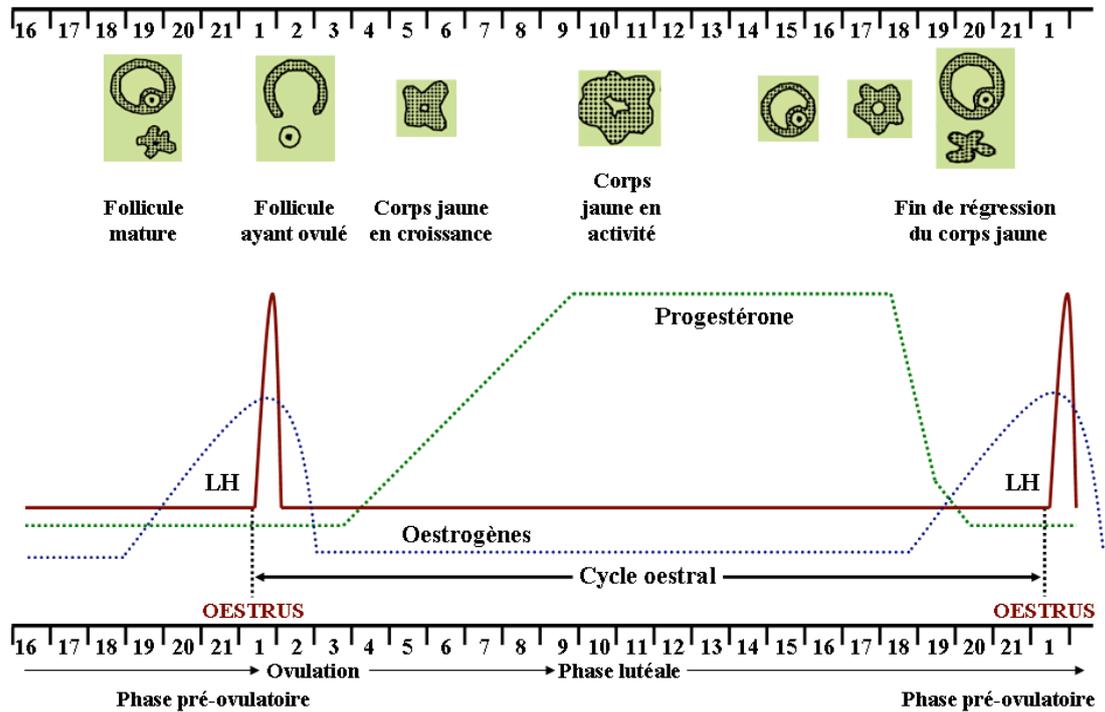


Figure A-3 - Implication des protéines de liaison dans la détection de la phéromone sexuelle de l'éléphant. Le Z7-12:Ac est lié à l'ESA (elephant serum albumin) dans l'urine alcaline de femelle en oestrus. Le mucus acide de la trompe du mâle, lorsqu'il entre en contact avec l'urine induit la dissociation du complexe ESA-(Z7-12:Ac). Le Z7-12:Ac ainsi libre dans la trompe du mâle peut se lier aux récepteurs sensoriels. Lorsque ce composé reste libre pendant un certain temps dans la trompe (20-30 sec.), il est lié par l'OBP. (D'après Lazar *et al.*, 2004).

l'albumine, une lipocaline (Lazar *et al.*, 2004). Sa libération est dépendante du pH. Le composé phéromonal est lié à la protéine jusqu'au moment de l'oestrus où le pH de l'urine s'abaisse, en parallèle avec la chute de progestérone dans le sang. L'albumine change de conformation à pH acide et libère la phéromone, qui est ensuite vaporisée à température de l'urine (Figure A-3). L'albumine, outre son effet solubilisateur de la phéromone hydrophobe, permet de stocker le signal chimique jusqu'à sa libération au moment adéquat. Le Z7-12 :Ac n'a pas été détecté dans le tractus uro-génital des femelles, mais un de ses précurseurs a été identifié dans le foie (Rasmussen *et al.*, 2001). Une OBP a été caractérisée dans le mucus de la trompe du mâle, elle permet le transport de la phéromone jusqu'au VNO (Lazar *et al.*, 2002) (Figure A-3). Chez l'éléphant d'Afrique (*Loxodonta africana*), la phéromone d'oestrus est également composée de molécules répertoriées comme phéromones d'insectes : la frontaline, l'exo- et l'endo-brévicomine (phéromones d'agrégation de scolytes, charançon des pins) et l' α - et le β -farnésène (phéromones d'alarme de pucerons) (Goodwin *et al.*, 2006).

Les travaux très complets réalisés chez l'éléphant d'Asie, ainsi que les résultats obtenus par l'équipe du Dr. Archunan ont été à la base de notre stratégie de recherche. Pour la recherche d'odeurs spécifiquement associées à l'oestrus, nous avons choisi de nous focaliser sur l'urine, même si des prélèvements de mucus vaginal ont été effectués. De plus, notre démarche scientifique s'est appuyée, non pas sur l'identification exhaustive des composés de l'urine au cours du cycle œstral, mais sur une comparaison des profils chimiques d'urines obtenues à différents stades du cycle œstral (stade pré-oestrus, oestrus et phase lutéale). Au fur et à mesure des résultats expérimentaux obtenus, les périodes considérées ont varié de façon à se rapprocher au maximum du moment de l'oestrus : le stade pré-oestrus passant de 3 jours à 24 heures avant l'oestrus. Notre intérêt s'est focalisé sur les composés apparaissant ou variant au stade pré-oestrus ou oestrus.

A



B

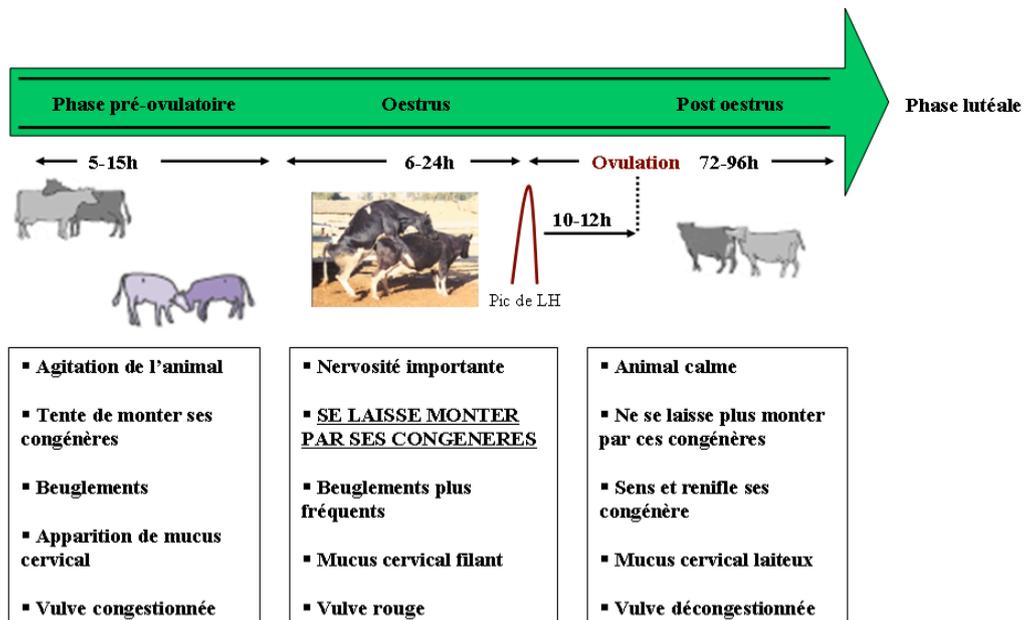


Figure A-4 - Le cycle oestral de la vache. Schémas simplifiés des événements ovariens, hormonaux (A) et comportementaux (B) se produisant au cours du cycle oestral chez la vache (d'après Marichatou *et al.*, fiche technique n°9 INERA-CIDRES, Décembre 2004). LH = hormone lutéinisante.

L'identification des composés chimiques spécifiques de l'oestrus dans les urines et les mucus vaginaux de vaches a été entreprise sur plusieurs lots d'animaux distincts au cours de cinq sessions de collecte différentes. Pour une meilleure lisibilité, chaque session de collecte sera référencée dans les paragraphes qui suivent de la façon suivante :

- « Nouzilly 1 » : 6 vaches de réforme en cycles naturels
- « Nouzilly 2 » : 6 vaches de réforme synchronisées
- « Châteauvillain 1 » : 6 vaches de réforme synchronisées et superovulées
- « Châteauvillain 2 » et « Châteauvillain 3 » : 6 et 8 vaches de réforme synchronisées
- « Nouzilly 3 » : 8 génisses en cycles naturels

Le suivi du cycle oestral au cours des collectes a été réalisé par un dosage des taux d'hormones plasmatiques (Progestérone (P4), Hormone lutéinisante (LH), oestradiol (E2)) associé aux observations comportementales effectuées au moment de l'échantillonnage (cf. « Matériels et Méthodes », Annexes 1, 2 et 3). La fin de cycle est hormonalement définie par une chute de la progestérone, concomitante à une augmentation du taux d'oestrogènes plasmatiques, régissant la manifestation des signes d'oestrus (Figure A-4A). Cette phase du cycle correspond à la **phase folliculaire pré-ovulatoire** ou pré-oestrus. Au cours de cette période, les femelles peuvent, mais de façon non systématique, montrer des signes de chaleurs dits secondaires : agitation des animaux, beuglements, frottements joue contre joue. En élevage, des tentatives de monte entre congénères sont également observées. Les congénères se reniflent et lèchent la vulve de la vache en chaleurs. Un écoulement de mucus vaginal et des mictions plus fréquentes peuvent également être observées. La manifestation de ces signes secondaires est très variable d'une vache à l'autre, quelques-uns ou l'ensemble des signes pouvant apparaître 24 à 36 h avant l'oestrus (Figure A-4B). L'acceptation de la monte par les congénères ou par le mâle caractérise l'entrée en **oestrus** et est concomitante à l'apparition du pic de LH, induit par un taux d'oestrogènes plasmatiques maximum. Ce pic de LH déclenche l'ovulation dans les 10 à 12 heures (Figure A-4). En absence de gestation, le taux de progestérone augmente à nouveau et on entre dans une phase dite de post-oestrus ou **di-oestrus**. La **phase lutéale** correspond à la période du cycle où le taux de progestérone atteint un plateau. Au cours des expérimentations, l'observation et la mesure de ces différents paramètres ont permis d'estimer les différents stades du cycle et de définir différents types de

chaleurs en fonction du moment de l'apparition et de la persistance des signes comportementaux:

- des chaleurs discrètes ou absentes, au cours desquelles aucun comportement significatif n'a été observé,
- des chaleurs classiques apparaissant dans les 48 heures ayant suivi la 2nde injection de PGF2 α et durant +/- 18h,
- des chaleurs tardives apparaissant dans les 72 heures ayant suivi la 2nde injection de PGF2 α ,
- des chaleurs longues se prolongeant sur 24 à 36 heures.

Les différents stades du cycle ont été définis par corrélation des taux d'hormones plasmatiques mesurés avec les observations comportementales (Annexes 1, 2 et 3).

L'ensemble des résultats est présenté dans l'ordre chronologique des expérimentations réalisées, de façon à mettre en évidence les choix méthodologiques faits tant au niveau des protocoles de collecte des échantillons qu'au niveau de leurs méthodes d'analyse. Une double page résume l'ensemble des résultats obtenus pour chaque collecte réalisée. Sur le verso, face au texte, les chromatogrammes comparés au cours du cycle d'une ou plusieurs vaches sont présentés à titre d'exemple pour illustrer le propos. Le stade du cycle correspondant pour chaque chromatogramme est indiqué à droite de la figure par une échelle de temps. Par souci de lisibilité, l'ensemble des chromatogrammes obtenus n'est pas présenté, mais pour chaque session un exemple de comparaison des chromatogrammes obtenus pour une ou deux vaches (en fonction de la pertinence des composés observés) au cours du cycle étudié est présenté.

Deux tableaux répertoriant les composés identifiés comme spécifiques d'un stade donné résument l'ensemble des données obtenues après les analyses par GC/MS des extraits urinaires et muqueux, et sont présentés à l'intérieur de la double page avec les spectres de masse des composés qualifiés de spécifiques. Un composé est défini comme spécifique d'un stade lorsqu'il est soit présent de manière exclusive au stade défini, soit qu'une augmentation significative de sa présence dans le mélange chimique urinaire est observée. Un doublement de sa proportion relative dans le mélange, mesurée par l'évolution de l'aire de son pic par rapport à l'ensemble du chromatogramme, est considérée comme significative (moyenne réalisée entre deux à trois analyses par GC/MS).

A-I - Essais préliminaires – Standardisation des protocoles

Des études préliminaires ont été réalisées sur des échantillons urinaires collectés sur des vaches de réforme à la station expérimentale de Nouzilly, collecte « Nouzilly 1 » (Dr. C. Briant et l'équipe des animaliers de la station expérimentale de Nouzilly, INRA, Tours). Divers soucis techniques ne nous ont pas permis de réaliser des analyses comparatives pertinentes. En effet, aucune différence significative des profils chimiques urinaires n'a pu être mise en évidence. Ces premiers résultats nous ont toutefois permis d'ajuster les protocoles de collecte et d'extraction chimique des échantillons. Lors de cette collecte les échantillons d'urine ont été prélevés directement dans la vessie à l'aide d'un cathéter. Ce mode de prélèvement invasif a empêché la collecte de tous les composés présents au niveau de la zone péri-vaginale de l'animal, zone examinée attentivement par le taureau (mucus vaginal, spécifique du stade oestrus, sécrétions vulvaires, ...). Or le mucus vaginal de vache en oestrus est décrit comme induisant des comportements de flehmen et d'approche chez le taureau (Hart *et al.*, 1946, Sankar & Archunan, 2004). De plus, les prélèvements post-oestrus (« J+7 ») et pré-oestrus (« J+18 », soit « J-2 » ou « J-3 ») ne sont pas être clairement distincts d'un point de vue hormonal (Figure A-4A) et correspondent à des stades physiologiquement trop proches.

Ainsi, des modifications ont été apportées au protocole de collecte. Les urines de la collecte « Nouzilly 2 » ont donc été réalisées (Dr. S. Vyas, Post-doctorant, Unité Expérimentale de Nouzilly, INRA de Tours) lors de mictions spontanées, et non plus de façon invasive, sur 6 vaches synchronisées dans leur cycle par double injection de prostaglandine (PGF2 α) espacée de 12 jours, pour faciliter la détermination de l'oestrus. En effet, dans sa thèse, Rajanarayanan (2004) a montré qu'il n'existe pas de différence entre les profils chimiques urinaires des bufflesses synchronisées et ceux des bufflesses non synchronisées. Suite à une synchronisation par PGF2 α , l'oestrus est observé théoriquement dans les deux à trois jours suivant la 2nde injection de PGF2 α . Les collectes ont été réalisées à J+1 (stades pré-oestrus ou phase folliculaire pré-ovulatoire), J+2 (œstrus) et J+10 (phase lutéale) après la 2nde injection de PGF2 α . Lorsque que cela était possible, du mucus vaginal a également été collecté.

L'extraction des composés chimiques de la première collecte a été réalisée par SPME à l'aide d'une fibre PDMS, fibre utilisée avec succès pour l'étude des composés phéromonaux sexuels de l'urine d'éléphante en pré-oestrus (Rasmussen, 2001). Il a donc été envisagé pour les analyses suivantes de tester d'autres fibres SPME (PDMS, CAR/PDMS, DVD/CW,

Collecte « Nouzilly 2 »

Analyse des urines - Extraction en mode SPME

Comparaison des profils chromatographiques

Tableaux de synthèse des composés identifiés dans les urines
Structure chimique et spectres de masse des composés identifiés

Rt (min)	Composé identifié	Référence de la vache					
		Vache 150	Vache 157	Vache 1494	Vache 2113	Vache 6450	Vache 9040
10.48	2-butanone	(PO)		(PO)	(PO)	(PL)	(O)
35.89	Diméthyl-sulfone (DMSO ₂)	(O)		(PO)	(PL)	(PO)	(PL)
55.50	2-isopropyl-5-méthyl-2-hexanal	(PO)(O)	(PL)	(PO)	(PO)	(PL)	
59.13	Composé silicé	(PO)	(PO)	(PO)			(PO)
62.02	α -damascenone	(O)	(PL)	(PO) (PL)	(PO)	(PO)(O) (PL)	(O)

Tableau A-1 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les vaches collectées lors de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction par SPME. Les phases du cycle auxquelles les composés augmentent de façon significatives sont indiquées par les abréviations suivantes : (PO) = Phase pré-oestrus, (O) = oestrus, (PL) = Phase lutéale.

Rt (min)	Composé identifié	Stade du cycle		
		PO	O	PL
10.48	2-butanone	3/6	1/6	1/6
35.89	Diméthyl-sulfone (DMSO ₂)	2/6	1/6	2/6
55.50	2-isopropyl-5-méthyl-2-hexanal	3/6	1/6	2/6
59.13	Composé silicé	4/6	0/6	0/6
62.02	α -damascenone	3/6	3/6	3/6

Tableau A-2 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vache présentant les mêmes variations pour un composé donné en fonction du stade du cycle après extraction SPME des urines de la collecte « Nouzilly 2 ».

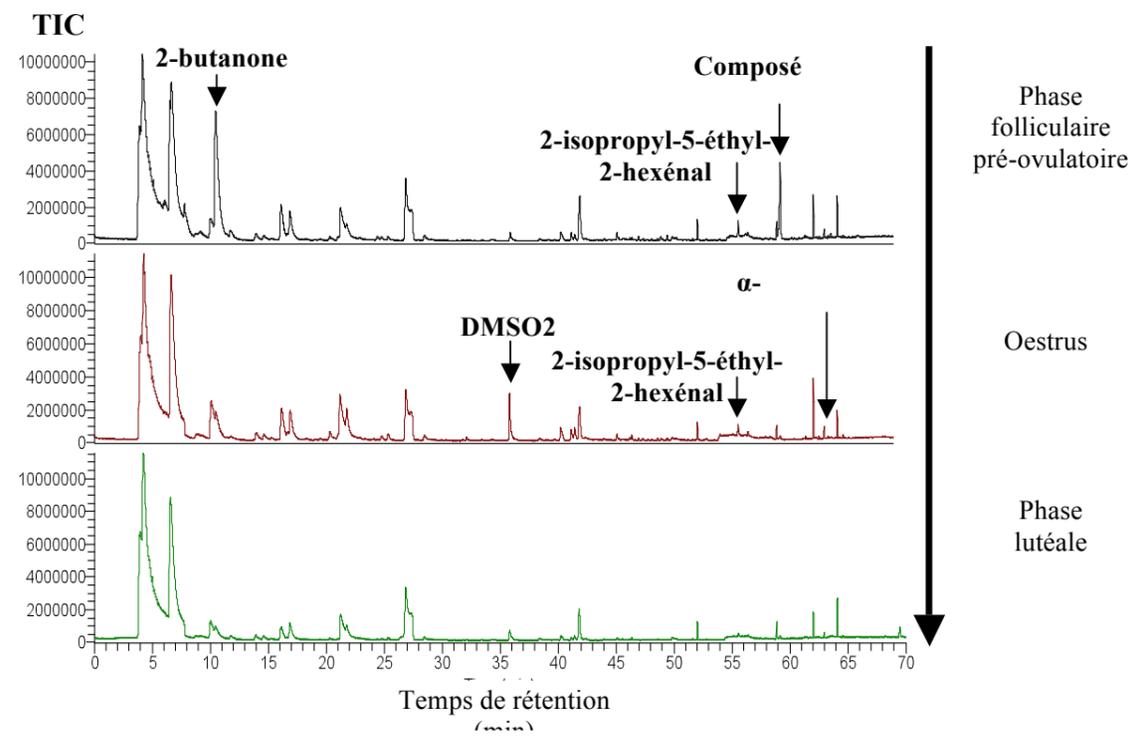


Figure A-5 - Profils chromatographiques comparés des urines de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction par SPME - Exemple de la vache 150 - DMSO2 = diméthyl sulfone.

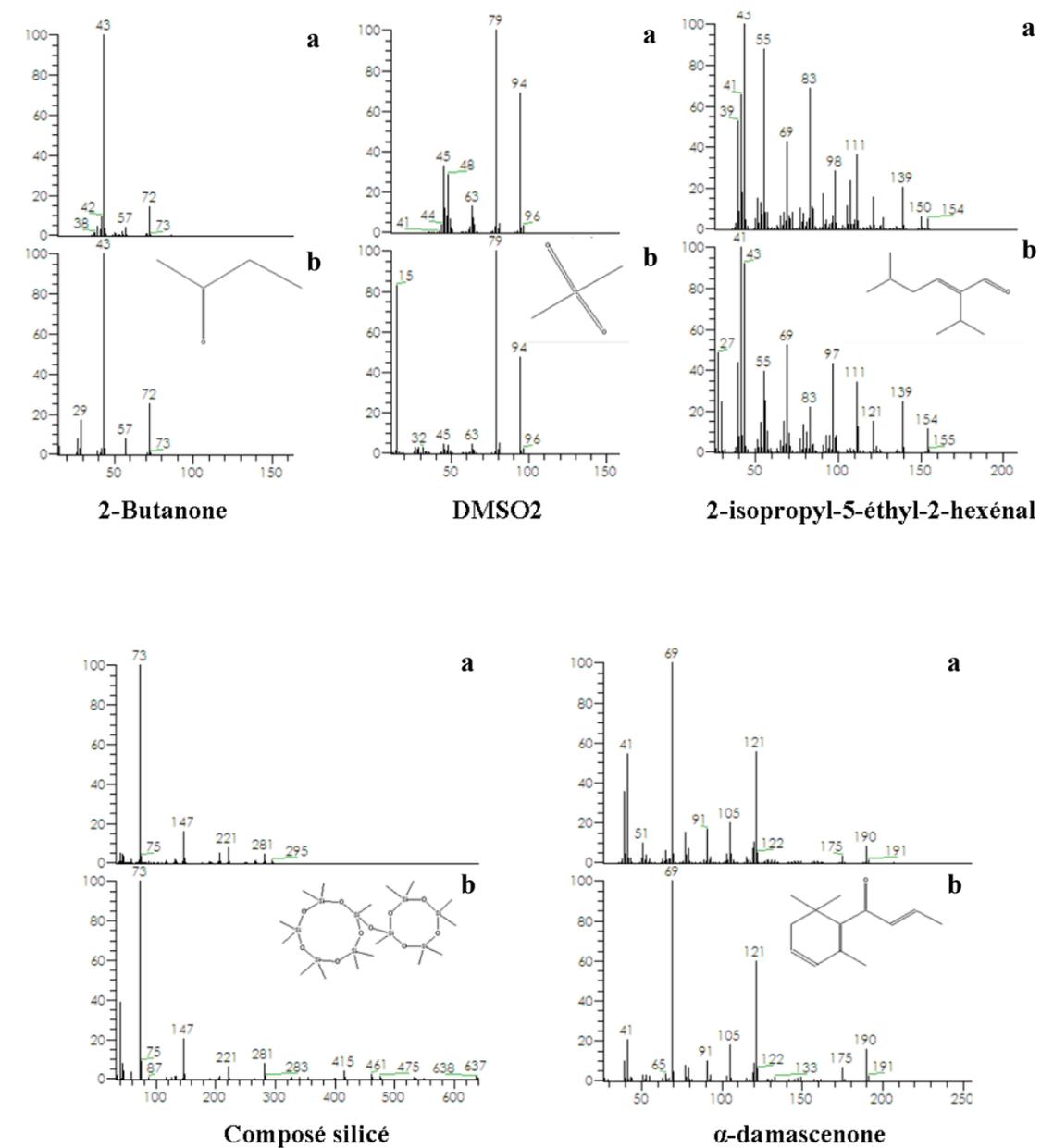


Figure A-6 - Composés variant au cours du cycle dans les urines de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction par SPME – Identification après interrogation de la banque NIST – Spectres de masses obtenus (a) comparés avec les spectres de référence de la banque NIST (b).

PDMS/DVB) présentant des propriétés d'adsorption différentes. Les phéromones sexuelles de la bufflesse mais aussi de la vache de race Jersey ayant pu être identifiées à partir d'une extraction des urines au dichlorométhane (DCM) (Kumar *et al.*, 2000 ; Sankar & Archunan, 2004 ; Rajanarayanan, 2004), ce mode d'extraction a également été testé.

A-I-1 - Analyse des urines

A-I-1-1 - Extraction des urines par SPME

Après avoir testé différentes fibres SPME, nous avons fixé notre choix sur la fibre CAR/PDMS qui permet d'obtenir un spectre plus large de composés (exposition en mode espace de tête pendant 1 heure à 37°C sous agitation).

L'analyse des extraits urinaires par GC/MS montre des profils chimiques semblables pour les 6 vaches avec peu de variation de profil au cours du cycle. La vache 150 (Figure A-5) est la vache qui a présenté les variations de profil chimique les plus nets, avec cinq composés présents en proportion plus importante en phase folliculaire pré-ovulatoire et/ou oestrus : la 2-butanone (Rt = 10.48 min), la diméthylsulfone, DMSO₂ (Rt = 35.89), le 2-isopropyl-5-éthyl-2-hexanal (Rt = 55.50), l' α -damascenone (Rt = 62,02 min) et un composé silicé (Rt = 59,13 min) (Figure A-6). La 2-butanone, la DMSO₂ et le composé silicé sont les trois composés montrant le plus de variation, les deux autres composés étant présents en proportion moindre. Ces cinq composés sont retrouvés dans les urines des cinq autres vaches mais de façon non spécifique d'un des trois stades considérés (Tableaux A-1 et A-2).

La 2-butanone est retrouvée en proportion beaucoup plus importante en phase folliculaire pré-ovulatoire et/ou de l'oestrus chez les vaches 150 (Figure A-5), 1494, 2113 et 9040 (aire des pics de 50 à 100 fois plus importante), et de façon spécifique de la phase lutéale chez la vache 6450 (Tableau A-1). De la même façon, la DMSO₂ est retrouvée de façon spécifique soit de la phase folliculaire pré-ovulatoire et/ou de l'oestrus, soit de la phase lutéale chez l'ensemble des vaches (Tableaux A-1 et A-2). Curieusement, le composé silicé est spécifiquement présent au stade pré-oestrus. Or ce composé est classiquement attribué à des contaminations (septum de l'injecteur, colonne qui perd sa phase). Les injections ayant été réalisées de façon aléatoire, il semble que ce composé silicé est présent dès la collecte d'urine.

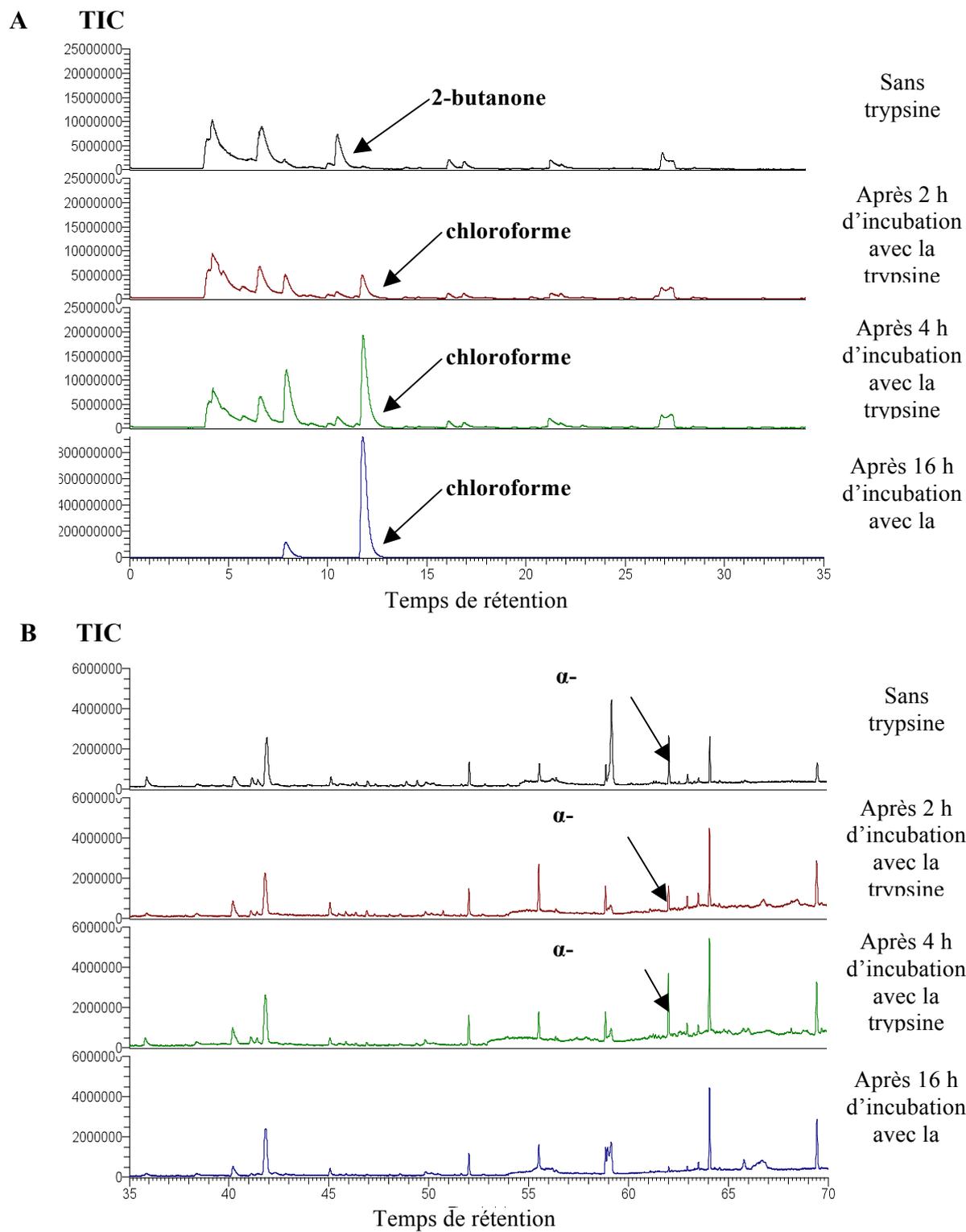


Figure A-7 - Profils chromatographiques comparés des urines de la vache 150 au stade folliculaire pré-ovulatoire après extraction par SPME à la suite du traitement trypsique - (A) Détail des chromatogrammes de 0 à 35 min, (B) Détail des chromatogrammes de la 35^{ème} à la 70^{ème} min.

Dans leurs travaux sur la phéromone sexuelle de l'éléphant, Rasmussen et coll. ont montré que la quantité de Z7-12:Ac est plus importante après avoir expérimentalement diminué le pH (de 8 à 6), ainsi qu'après traitement des urines par des enzymes protéolytiques (Rasmussen, 2001). Ces deux traitements entraînent une modification ou la lyse des protéines, permettant la libération de la phéromone. Dans notre cas, l'acidification des urines jusqu'à pH 5 n'a pas induit de modification des profils chromatographiques urinaires. En revanche, après traitement des urines 2 h à la trypsine, protéase spécifique des résidus lysine et arginine, on observe la disparition de la 2-butanone et l'apparition de chloroforme (Figure A-7A). Après une nuit de traitement, le chloroforme devient le composé majoritaire des urines, tandis que la 2-butanone et l' α -damascenone ont complètement disparu (Figure A-7A et A-7B). Les extractions ayant été réalisées à l'aide d'une fibre SPME, toute contamination par le solvant d'extraction est exclue. Les spectres de masse des composés variant suite à un traitement à la trypsine sont présentés en Figure A-8.

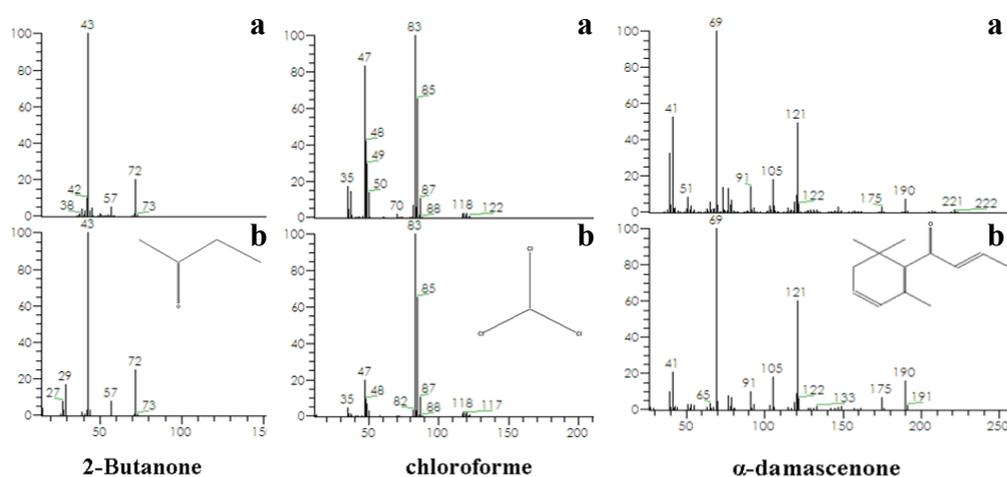


Figure A-8 - Composés identifiés dans les urines de la collecte « Nouzilly 2 » – Identification après interrogation de la banque NIST – Spectres de masses obtenus (a) comparés avec les spectres de référence de la banque NIST (b).

Collecte « Nouzilly 2 »
Analyse des urines - Extraction au DCM

Comparaison des profils chromatographiques
 Tableaux de synthèse des composés identifiés dans les urines
 Structure chimique et spectres de masse des composés identifiés

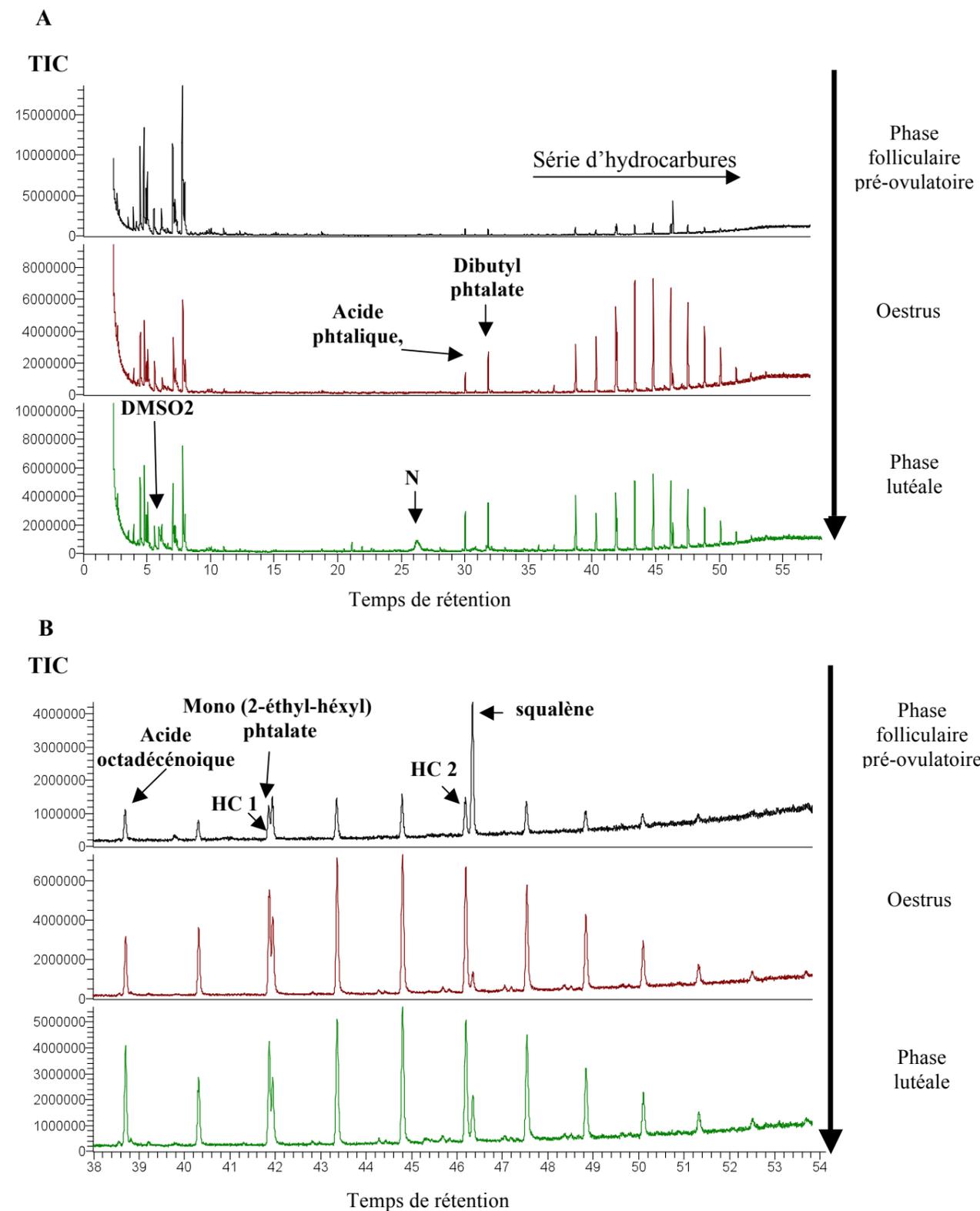


Figure A-9 - Profils chromatographiques comparés des urines de vache collecte « Nouzilly 2 » après extraction au DCM – exemple de la vache 157. (A) Chromatogrammes entiers, (B) Détail de la 35^{ème} à la 70^{ème} min. DMSO2 = diméthyl sulfone, NI = composé non identifié, HC 1 et HC 2 = hydrocarbures 1 et 2 variant au cours du cycle.

Rt (min)	Composé identifié	Référence de la vache					
		Vache 150	Vache 157	Vache 1494	Vache 2113	Vache 6450	Vache 9040
5.86	DMSO ₂	(O)	(PL)	(PO)	(PL)	(PO)	(PL)
26.20	NI		(PL)	(O) (PL)		(PL)	(PL)
30.03	Acide phtalique, diisobutyl ester		(PO) (PL)			(PO) (PL)	(PO) (PL)
31.83	Dibutyl phtalate		(O) (PL)			(PO) (PL)	(PL)
41.86	Hydrocarbure 1		(PO) (PL)	(O) (PL)	(O) (PL)		
41.93	Mono (2-éthyl-héxyl) phtalate	(O)(PL)	(PO) (O) (PL)	(PO) (O) (PL)	(PO) (O) (PL)	(PO) (O) (PL)	(PO) (O) (PL)
46.19	Hydrocarbure 2		(PO) (PL)	(O)(PL)	(O)	(PO) (O) (PL)	
46.31	Squalène	(PO) (PL)	(PO) (PL)	(PL)	(PO) (PL)	(PO) (PL)	(PO)

Tableau A-3 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les vaches collectées lors de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction par DCM. Les phases du cycle auxquelles les composés augmentent de façon significatives sont indiquées par les abréviations suivantes : (PO) = Phase pré-oestrus, (O) = oestrus, (PL) = Phase lutéale, NI = composé non identifié.

Rt (min)	Composé identifié	Stade du cycle		
		PO	O	PL
5.86	DMSO ₂	2/6	1/6	3/6
26.20	NI	0/6	1/6	4/6
30.03	Acide phtalique diisobutyl ester	2/6	0/6	2/6
31.83	Dibutyl phtalate	1/6	1/6	3/6
41.86	Hydrocarbure 1	1/6	2/6	3/6
41.93	Mono (2-éthyl-héxyl) phtalate	5/6	6/6	6/6
46.19	Hydrocarbure 2	2/6	3/6	3/6
46.31	Squalène	4/6	0/6	5/6

Tableau A-4 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé donné en fonction du stade du cycle après extraction au DCM des urines de la collecte « Nouzilly 2 ». NI = composé non identifié.

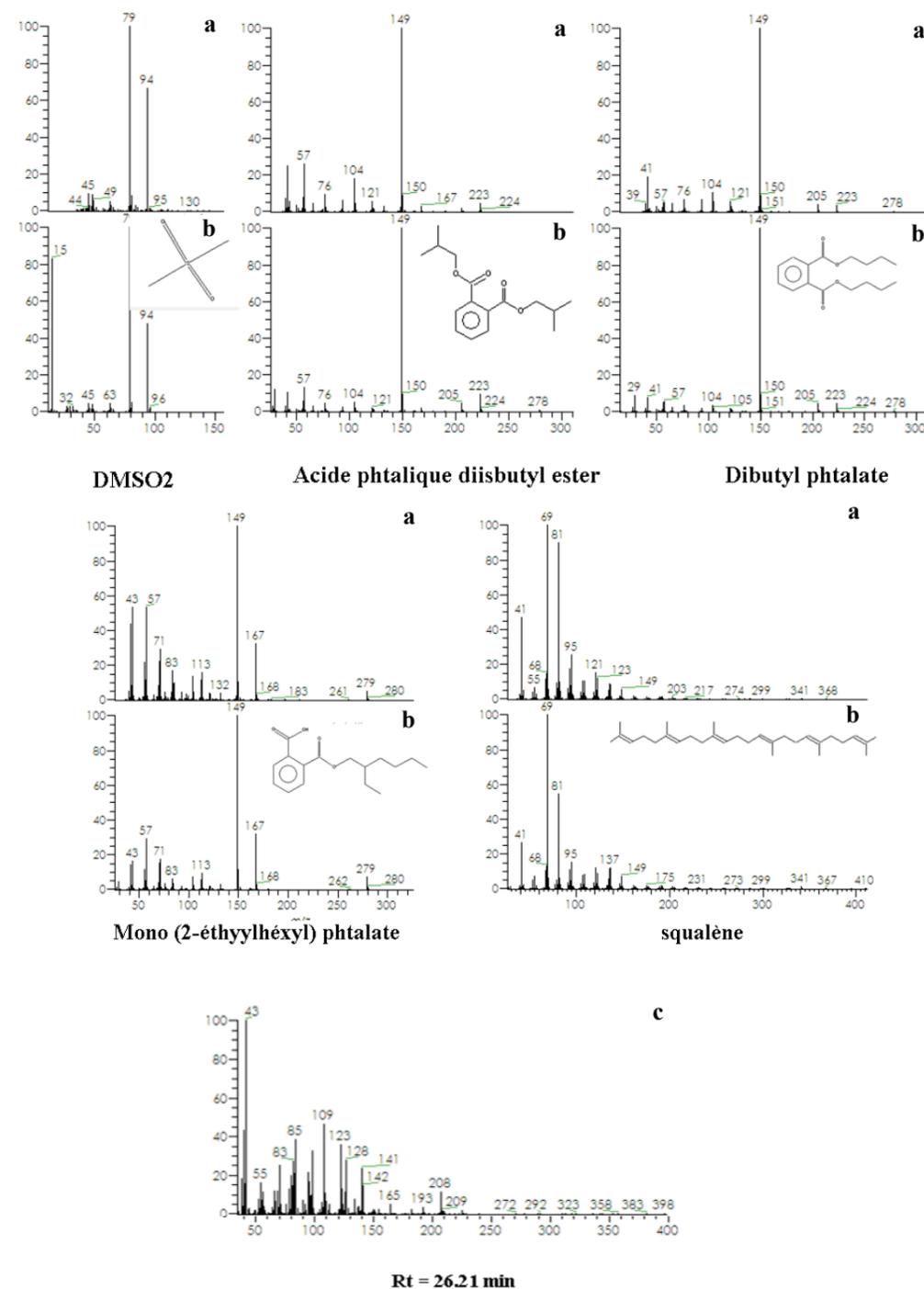


Figure A-10 - Composés identifiés dans les urines de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction au DCM – Spectres de masses obtenus (a) comparés avec les spectres de référence de la banque NIST (c), spectre de masse obtenu pour le composé Rt = 26,21 min non identifié (c).

A-I-1-2 - Extraction des urines au DCM

Des extractions à l'aide de solvants organiques (dichlorométhane (DCM), hexane, pentane) ont été réalisées sur ces mêmes urines. Après quelques tests préliminaires, nous avons choisi d'utiliser le DCM, qui permet d'obtenir le profil d'extraction le plus large. Ce même solvant, utilisé couramment pour l'étude de la composition chimique des urines de rongeurs, a permis l'identification des phéromones sexuelles dans les urines et fèces de vaches de race Jersey (Kumar *et al.*, 2000 ; Sankar & Archunan, 2007).

La **2-butanone** n'est retrouvée dans aucune des urines analysées. Ceci peut s'expliquer par le fait que les urines ont subi plusieurs phases de congélation/décongélation. Toutefois, l'utilisation du DCM permet l'extraction d'un grand nombre de composés (exemple de la vache 157 - Figure A-9A et A-9B) tout aussi volatils (faiblement retenus sur la colonne). L'injection d'un témoin DCM a permis de préciser que ces composés ne proviennent pas du DCM. En revanche, le composé $R_t = 41.93$, identifié comme du mono (2-éthylhexyl) phtalate est présent dans ce témoin. Quelques composés (Tableaux A-3 et A-4) varient au cours du cycle soit de façon non spécifique du stade, soit ne sont présents que chez un ou deux animaux. La $DMSO_2$, retrouvée ici de façon similaire à ce qui avait été observé lors des extractions par SPME, c'est-à-dire sans réelle spécificité de stade, montre les variations les plus importantes (Tableau A-3). Seul le squalène ($R_t = 46,39$ min) voit sa proportion relative diminuer au stade oestrus (Figure A-9 – exemple de la vache 157) chez cinq des six vaches. On remarquera la présence en fin de chromatogramme d'une série d'hydrocarbures. Les spectres de masse de ces composés sont présentés Figure A-10.

A la suite de ces premiers résultats et en l'absence de composés clairement identifiés comme spécifiques, nous avons entrepris l'analyse d'un pool d'urine pour chaque stade. En effet, l'ensemble des identifications de phéromones répertoriées dans la littérature a été réalisé à partir de pool d'urines de plusieurs animaux. Il faut noter que les urines de la vache 150 n'ont pu être intégrées aux pools, faute d'échantillon à disposition (l'ensemble des urines avait été utilisé pour les expériences préliminaires de mise au point). Peu de composés ont pu être extraits. Toutefois, la $DMSO_2$, molécule présente de façon non spécifique lors des analyses individuelles, est retrouvée en quantité importante en phase lutéale. Ceci montre bien que l'analyse des urines de plusieurs animaux par pool en fonction du stade efface les spécificités inter-individuelles. Il aurait été intéressant de savoir si les variations de composés observées de façon individuelle étaient liées aux variations de comportement observées.

Collecte « Nouzilly 2 »
Analyse des mucus vaginaux

Comparaison des profils chromatographiques

Tableaux de synthèse des composés identifiés dans les urines

Structure chimique et spectres de masse des composés identifiés

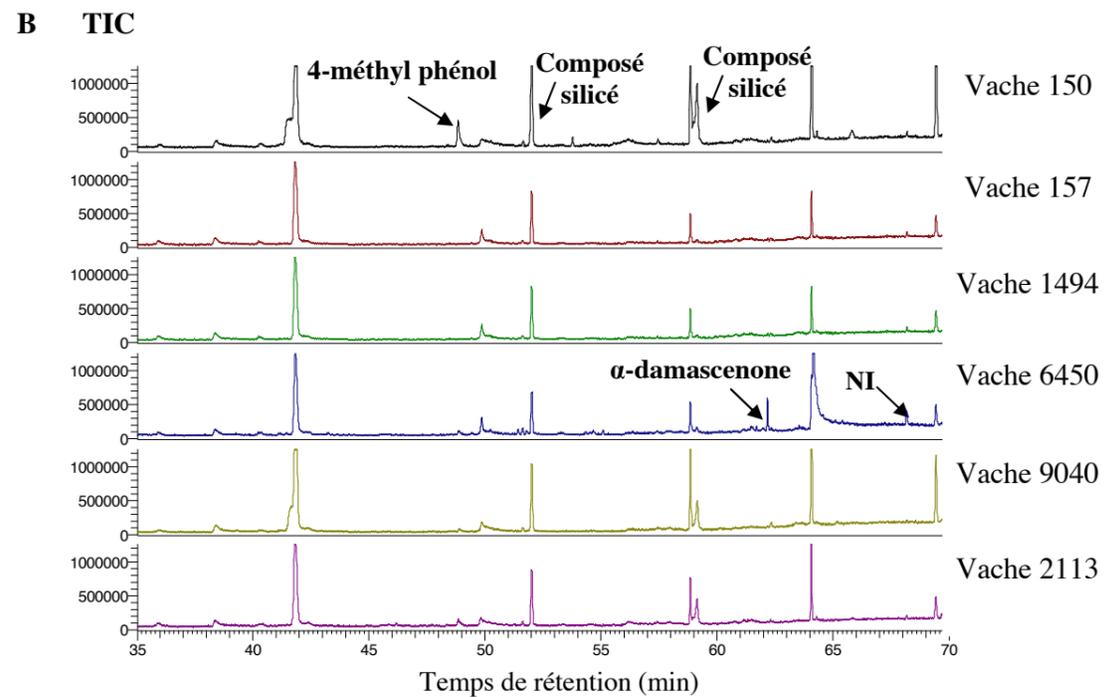
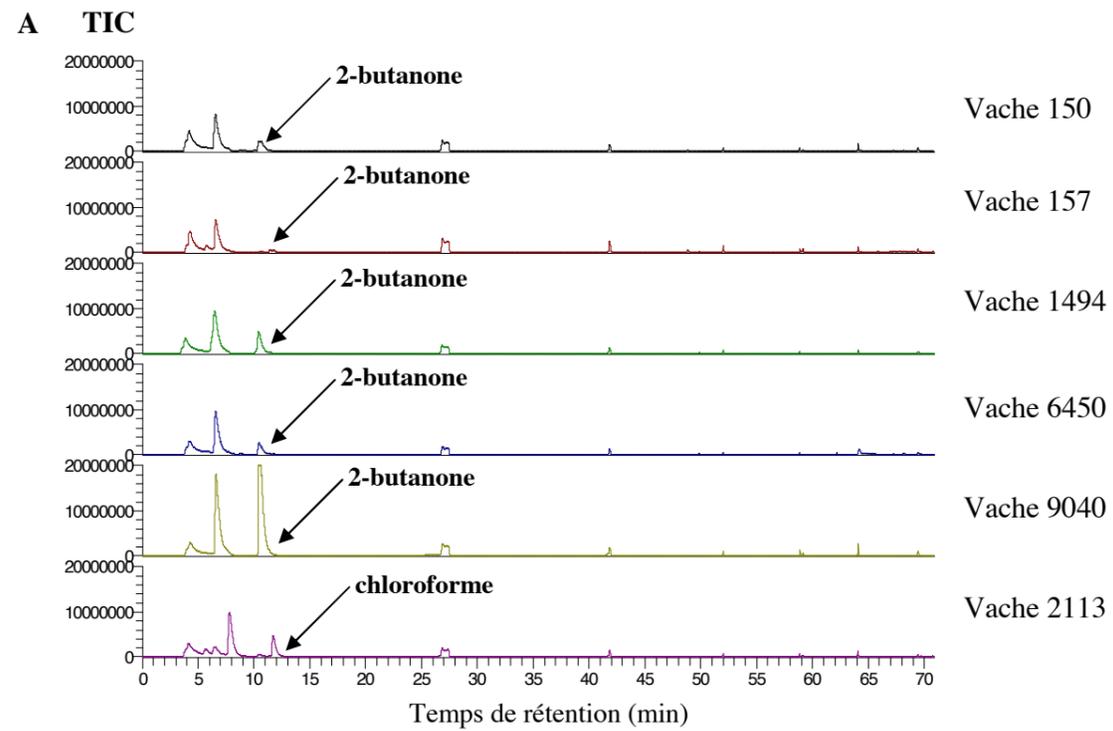


Figure A-11- Profils chromatographiques comparés des mucus vaginaux de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction par SPME – (A) Chromatogrammes entiers, (B) Détail de la 35^{ème} à la 70^{ème} min. DMSO₂ = diméthyl sulfone, NI = composé non identifié.

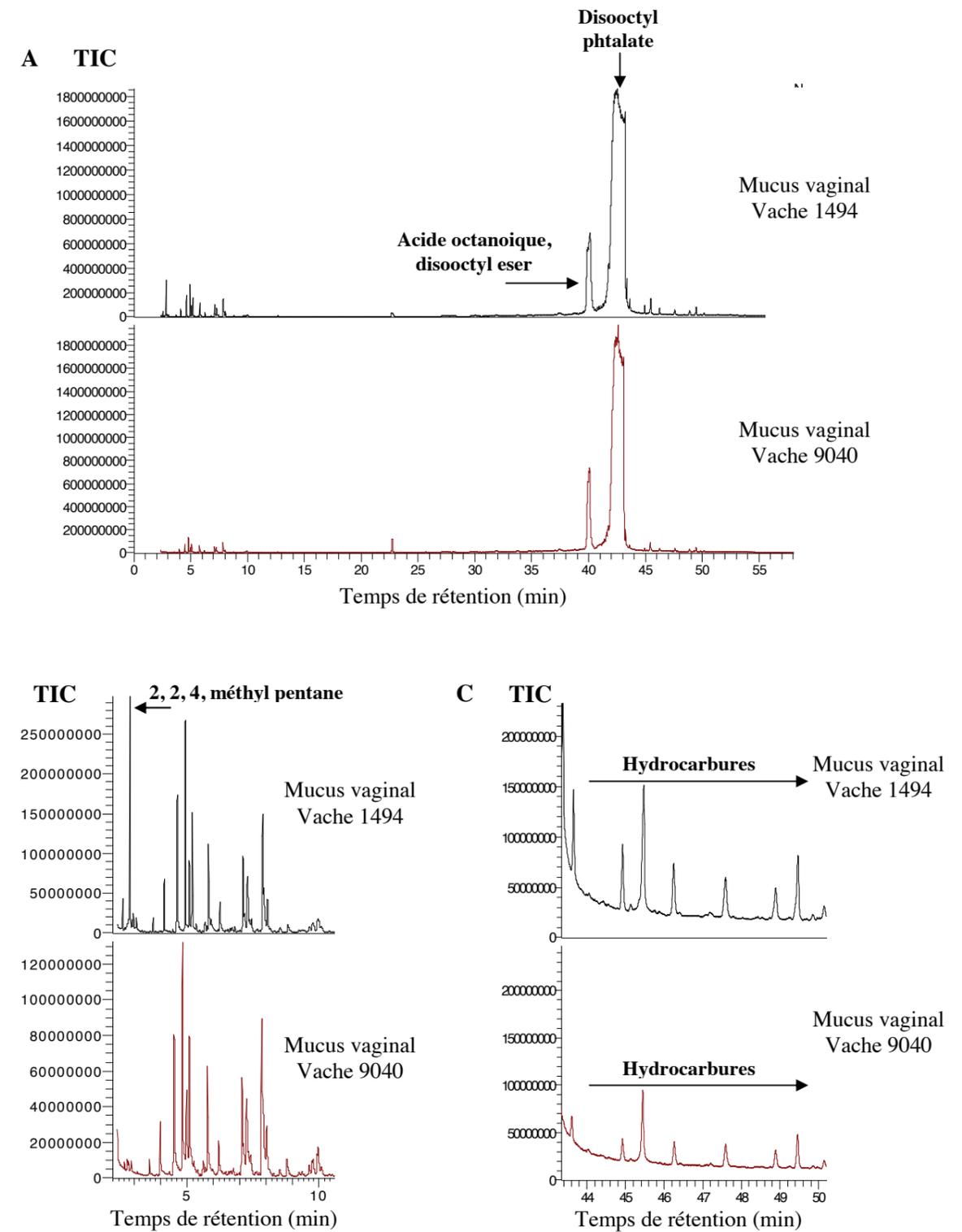


Figure A-12 - Profils chromatographiques comparés des mucus vaginaux de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction au DCM – Exemple des vaches 1494 et 9040. (A) Chromatogrammes entiers, (B) Détail de la 2^{ème} à la 10^{ème} min, (C) Détail de la 43^{ème} à la 50^{ème} min.

Malheureusement, nous n'avons pas à notre disposition les observations comportementales relatives à chaque animal lors des collectes. La présentation de ces mêmes pools d'urine (non extraits) à des taureaux n'ont pas permis de mettre en évidence de différence de comportements induits (Tests comportementaux réalisés à Nouzilly, Dr. C. Briant, INRA Tours, expériences réalisées sur 6 taureaux naïfs). La seule discrimination effectuée par les mâles est observée entre les urines (en général) et le témoin négatif (liquide physiologique).

A-I-2 - Extraction des mucus vaginaux

A-I-2-1 - Extraction des mucus vaginaux par SPME

Les profils chromatographiques des mucus vaginaux collectés en parallèle des urines montrent une composition chimique similaire quelque soit l'animal (Figure A-11A et A-11B). La 2-butanone est retrouvée chez cinq des six vaches, en proportion plus ou moins importante, avec une présence nettement majoritaire chez la vache 9040. Le mucus de la vache 2113 ne contient pas de 2-butanone mais une proportion importante de chloroforme (Figure A-11A). Ce composé a été identifié dans les urines de la vache 150 au stade pré-oestrus suite à un traitement trypsique (Figure A-8A).

Du 4-méthyl phénol, composé identifié dans les urines de bufflesse comme inducteur de flehmen (Rajananrayanan, 2004), est présent dans le mucus vaginal de la vache 150 ainsi qu'en faible proportion chez trois autres vaches (2113, 6450, 9040) (Figure A-11B). Il est à noter que l' α -damascenone, ayant un profil variant dans les urines de 5 des 6 vaches en pré-oestrus et en phase lutéale, est présent uniquement dans le mucus de la vache 6450 (Figure A-11B).

A-I-2-2 - Extraction des mucus vaginaux au DCM

Comme précédemment, les profils chromatographiques des mucus vaginaux extraits au DCM sont similaires pour l'ensemble des vaches (exemple des vaches 1494 et 9040 - Figure A-12A). Chez toutes les vaches, deux composés sont prédominants, l'acide octanoïque disooctyl ester et un phtalate, ainsi qu'une série d'hydrocarbures. Une seule différence entre les mucus vaginaux des six vaches a pu être observée. La vache 1494 présente un composé surnuméraire le 2, 2, 4 méthyl pentane (composé très volatil) (Figure A-12B). La même série d'hydrocarbures que celle observée dans les urines est présente dans l'ensemble des mucus dans des proportions variables (Figure A-12C).

A-I-3 - Conclusion sur la collecte « Nouzilly 2 »

Globalement, peu de variations ont pu être observées au cours des analyses réalisées sur les urines des vaches de la collecte « Nouzilly 2 ». Deux composés, la 2-butanone et le DMSO₂ ont montré une variabilité significative au cours du cycle chez l'ensemble des vaches, mais de façon spécifique du stade oestrus après extraction réalisée par SPME. Après extraction au DCM, seule la DMSO₂ est retrouvée. Il semble donc que l'extraction au DCM ne permette pas de solubiliser la 2-butanone de façon satisfaisante. L'extraction au DCM a permis l'extraction d'hydrocarbures variant dans leur proportion au cours du cycle. Ce mode d'extraction a donc été privilégié pour l'ensemble des expériences suivantes. Le squalène, composé minoritaire des urines extraites, voit sa proportion relative diminuer ou disparaître au stade oestrus chez une majorité des vaches.

A-II - Etude de la variabilité de la composition chimique des urines et des mucus vaginaux chez des vaches surperovulées ou non - « Collectes de Châteauvillain »

A-II-1 - Etude de la variabilité de la composition chimique des urines au cours du cycle oestral

Chez la vache, la période de l'oestrus pouvant être de très courte durée (entre 6 et 12h) l'intervalle entre deux collectes a été réduit. Lors des trois séries de collectes suivantes, que j'ai réalisé à la station expérimentale de Châteauvillain (UNCEIA), les urines ont été collectées 2 à 3 fois par jour (+/- toutes les 6 à 8 heures) pendant la période des chaleurs chez des animaux synchronisés. Les urines ont été collectées à partir de la 2^{nde} injection de PGF2 α , déclenchant la mise en place des chaleurs dans les 48 à 60 heures, et ceci pendant 4 jours. Pour les deuxième et troisième séries de collecte, un prélèvement une semaine (J+7 ou J+8) après la 2^{nde} injection de PGF2 α a été réalisé afin d'obtenir une urine correspondant au stade di-oestrus.

A-II-1-1 - Etude de la variabilité de la composition chimique des urines au cours du cycle oestral chez des vaches superovulées - « Châteauvillain 1 »

Cette session de collecte a été réalisée sur des animaux synchronisés et surperovulés, c'est-à-dire traités avec des hormones de façon à produire plusieurs ovules. Les urines ont été collectées la veille de la 2^{nde} injection de PGF2 α et les quatre jours suivants. Il n'y a donc pas eu de réelle collecte du stade di-oestrus, mais des collectes en fin d'oestrus. Les urines échantillonnées au cours de cette collecte ont été extraites par DCM et analysées par GC/MS. L'apparition de deux composés, le γ -chromène et le composé NI « Rt = 23,71 » (Figure A-13)

Collecte « Châteauvillain 1 »
Analyse des urines - Extraction au DCM

Comparaison des profils chromatographiques
 Tableaux de synthèse des composés identifiés dans les urines
 Structure chimique et spectres de masse des composés identifiés

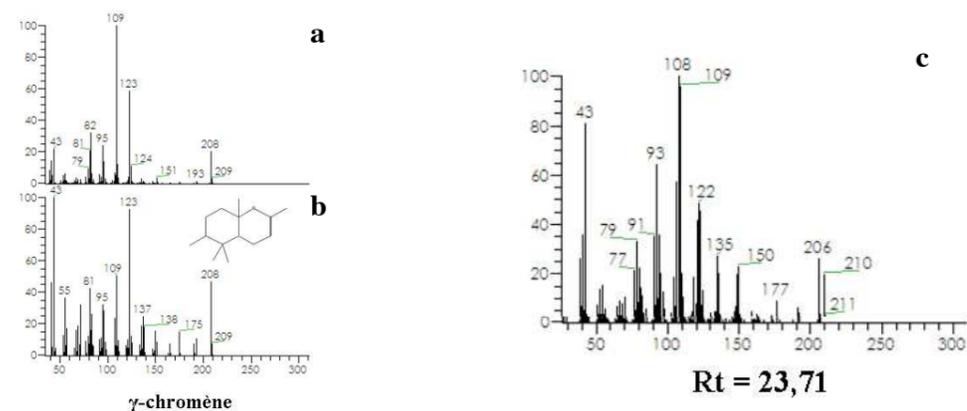


Figure A-13 - Composés identifiés comme spécifiques de stade dans les urines des vaches superovulées de la collecte « Châteauvillain 1 » - Spectres de masses obtenus (a) comparés avec les spectres de référence de la banque NIST (b), spectre de masse du composé non identifié Rt = 23,71 non identifié (c). Rt = temps de rétention.

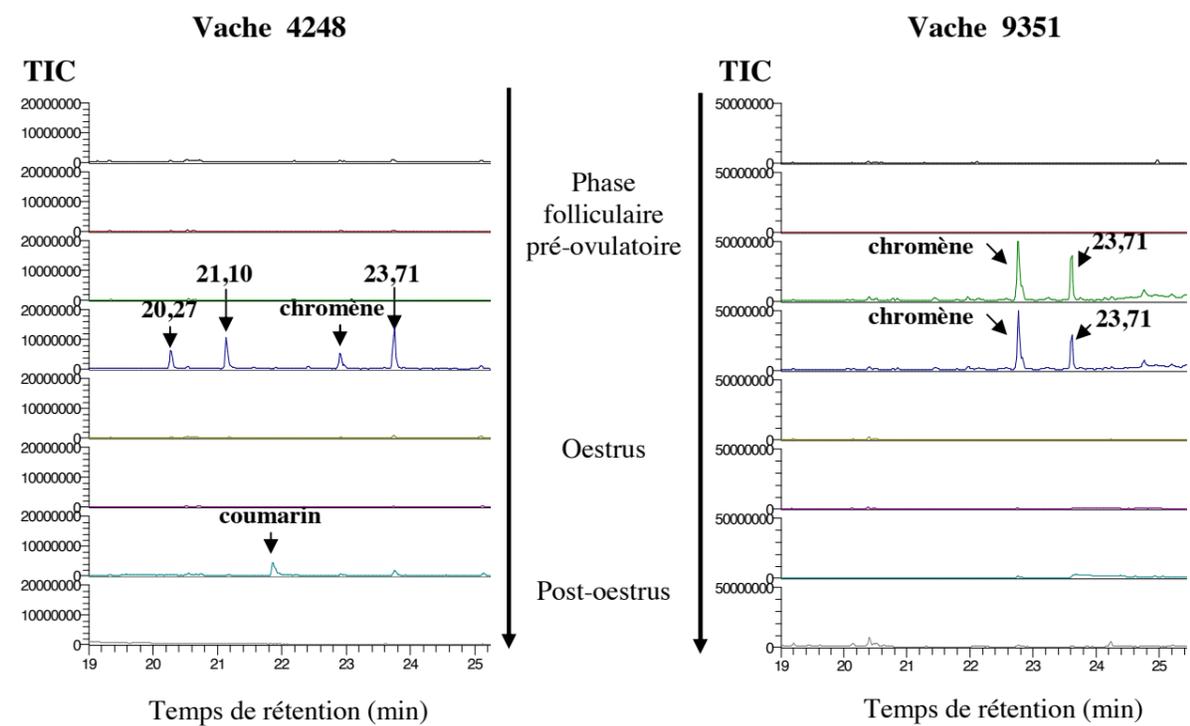


Figure A-14 - Profils chromatographiques comparés des urines des vaches 4248 et 9351 de la collecte « Châteauvillain 1 » au cours des chaleurs - Détail des chromatogrammes de la 19^{ème} à la 25^{ème} min.

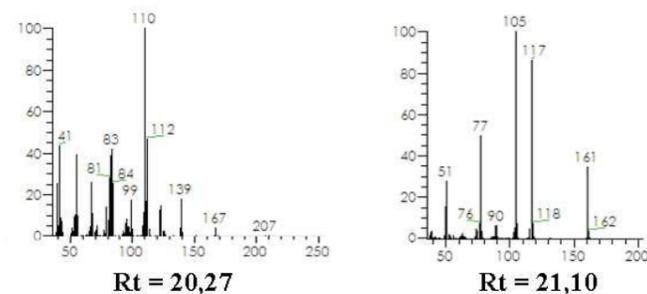


Figure A-15 - Composés non identifiés spécifiques du stade pré-oestrus dans les urines de la vache 4248 – Spectres de masse obtenus. Rt = temps de rétention.

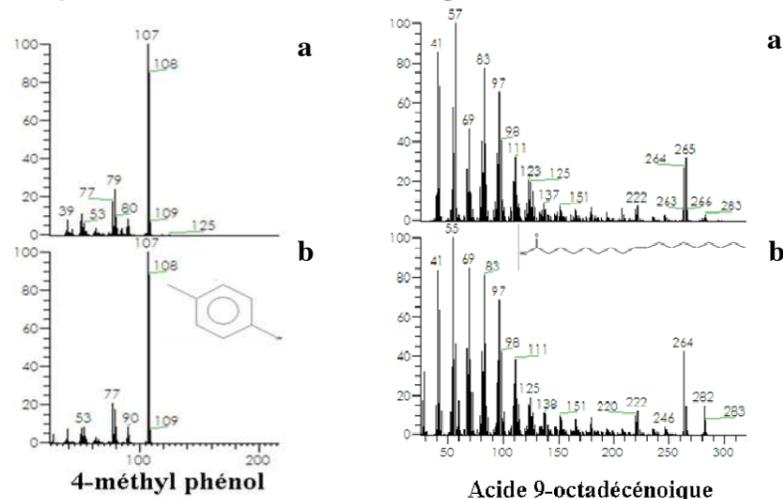


Figure A-16 - Composés identifiés dans les urines de buffesse (Rajananarayanan, thèse, 2004) en oestrus présentes dans les urines des vaches de la collecte « Châteauvillain 1 » - Spectres de masses obtenus (a) comparés avec les spectres de référence de la banque NIST (b).

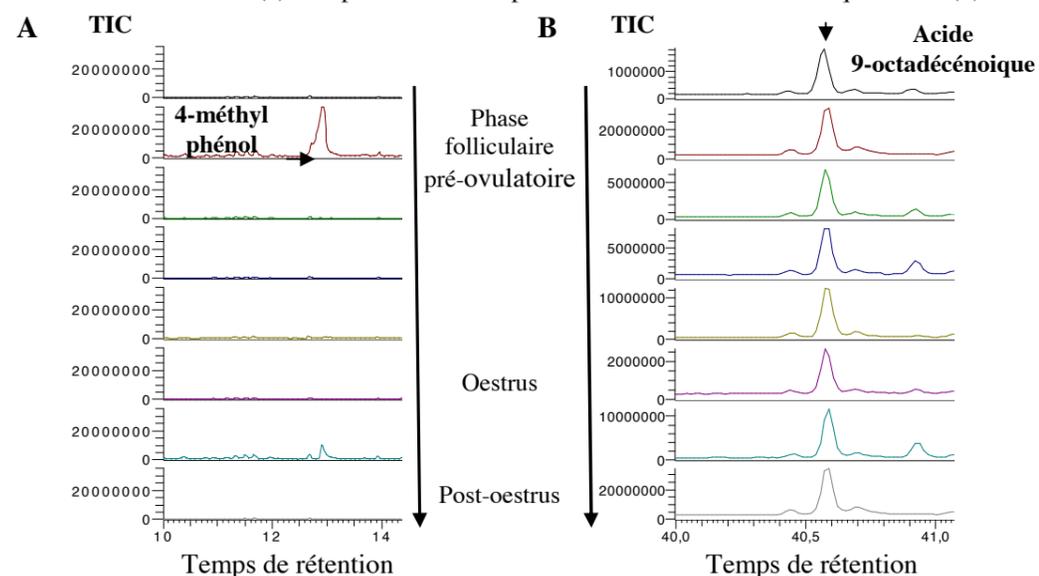


Figure A-17 - Le 4-méthyl phénol et l'acide 9-octadécénoïque dans les urines des vaches de la collecte « Châteauvillain 1 » - Exemple de la vache 5644 – (A) Détail de la 10^{ème} à la 14^{ème} min, (B) Détail de la 40^{ème} à la 41^{ème} min.

Type de chaleurs		Discrètes		Expressives		Prolongées	
Référence de la vache		0631	6262	4248	5260	9351	5644
Rt (min)	Composé identifié						
7.07	DMSO ₂					(PO)	(PO) (PoO)
12.94	4-méthyl phénol						(PO) (PoO)
20.27	NI			(PO)			
21.10	NI			(PO)			
21.85	2H-benzopyrazone ou coumarin			(O)			
22.75	2,5,5,6,1a-pentaméthyl-cis-1a,4a,5,6,7,8 hexahydro-γ-chromène	(PO) (O) (PoO)	(O)	(PO) (O)	(O)	(O)	(O)
23.71	NI (composé aromatique)			(PO)		(PO)	(PO)
25.47	7-méthyl-Z-tétradécen-1-ol acétate						(O)
26.17	NI	(PoO)					
31.48	(2amino-phényl)(pyrrolidin-1-yl) méthanone	(PoO)	(O) (PoO)				
32.18	NI	(PoO)					
36.97	Acide Z-8-méthyl-9-tétradécénoïque					(O)	(O)
42.04	NI (chaîne carbonée substituée)					(PO)	
47.01	Z-(13)-docosenamide		(PO) (O)				

Tableau A-5 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les vaches de la collecte « Châteauvillain 1 » après extraction par DCM. (PO) = Stade pré-oestrus, (O) = Oestrus, (PoO) = Post-oestrus. NI = composés non identifiés.

Rt (min)	Composé identifié	PO	O	PoO
7.07	DMSO ₂	2/6	0/6	1/6
12.94	4-méthyl phénol	1/6	0/6	1/6
20.27	NI	1/6	0/6	0/6
21.10	NI	1/6	0/6	0/6
21.85	2H-benzopyrazone	0/6	1/6	0/6
22.75	2,5,5,6,1a-pentaméthyl-cis-1a,4a,5,6,7,8 hexahydro-γ-chromène	2/6	6/6	1/6
23.71	NI (composé aromatique)	3/6	0/6	0/6
25.47	7-méthyl-Z-tétradécen-1-ol acétate	0/6	1/6	0/6
26.17	NI	1/6	0/6	0/6
31.48	(2amino-phényl)(pyrrolidin-1-yl) méthanone	2/6	1/6	0/6
32.18	NI	0/6	0/6	1/6
36.97	Acide Z-8-méthyl-9-tétradécénoïque	0/6	2/6	0/6
42.04	NI (chaîne carbonée substituée)	1/6	0/6	0/6
47.01	Z-(13)-docosenamide	1/6	1/6	0/6

Tableau A-6 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé en fonction du stade du cycle. NI = composés non identifiés. (PO) = Stade pré-oestrus, (O) = Oestrus, (PoO) = Post-oestrus. Les cases grisées correspondent aux composés présents chez une majorité de vache.

est observée 24 heures après la seconde injection de PGF2 α , au moment où un début d'agitation est observée chez l'ensemble des animaux, dans les urines de toutes les vaches (exemple des vaches 4248 et 9351, Figure A-14) (Tableau A-5). Le γ -chromène est présent de façon transitoire, 6 à 18 heures (soit sur deux ou trois collectes successives), avant l'oestrus chez l'ensemble des vaches hormis la vache 0631 où il persiste jusqu'à la dernière collecte. Il faut toutefois noter que chez cette vache, ayant montré des chaleurs silencieuses, il est présent en faible proportion. Le composé NI « Rt = 23,71 » (Figure A-15) est spécifique du stade pré-oestrus, n'étant présent que sur une courte période, entre 10 à 16 heures avant l'oestrus chez trois des six vaches, et notamment chez les vaches ayant montré des chaleurs classiques. Deux autres composés, non identifiés, Rt = 20,27 et Rt = 21,10 sont spécifiques du stade pré-oestrus mais uniquement chez la vache 4248 (Figure A-14 – Tableau A-5), vache ayant montré des chaleurs expressives.

La DMSO₂ est présente chez toutes les vaches à tous les stades. Mais chez deux des vaches, ce composé est retrouvé en proportions très variables en fonction du stade, montrant soit une augmentation, soit une diminution en oestrus, respectivement chez les vaches 9351 et 5644 (Tableau A-5).

L'analyse des extraits au DCM des urines montre des profils de composés au cours du cycle oestral variant de façon hétérogène (Tableau A-5). Ces variations de profils chimiques ne semblent pas liées aux types de chaleurs (silencieuses, expressives ou prolongées) exprimées par les vaches (Tableau A-5), la présence d'un composé ne pouvant pas y être reliée. Toutefois, le faible nombre d'animaux étudié ne permet pas de généraliser ces informations.

Il est à noter que deux composés spécifiques des urines de bufflesse en oestrus, le 4-méthyl phénol et l'acide 9-octadécénoïque (Rajanarayanan, 2004) ont été identifiés dans les urines analysées. Le 4-méthyl phénol (Figure A-16), présent chez une seule des six vaches (5644), est présent en phase folliculaire pré-ovulatoire (Figure A-17A ; Tableaux A-5 et A-6). L'acide 9-octadécénoïque (Figure A-16) est présent dans les urines des six vaches à tous les stades du cycle analysés (Figure A-17B).

Collecte « Châteauvillain 2 »
Analyses des urines – Extraction au DCM

Comparaison des profils chromatographiques
 Tableaux de synthèse des composés identifiés dans les urines
 Structure chimique et spectres de masses des composés identifiés

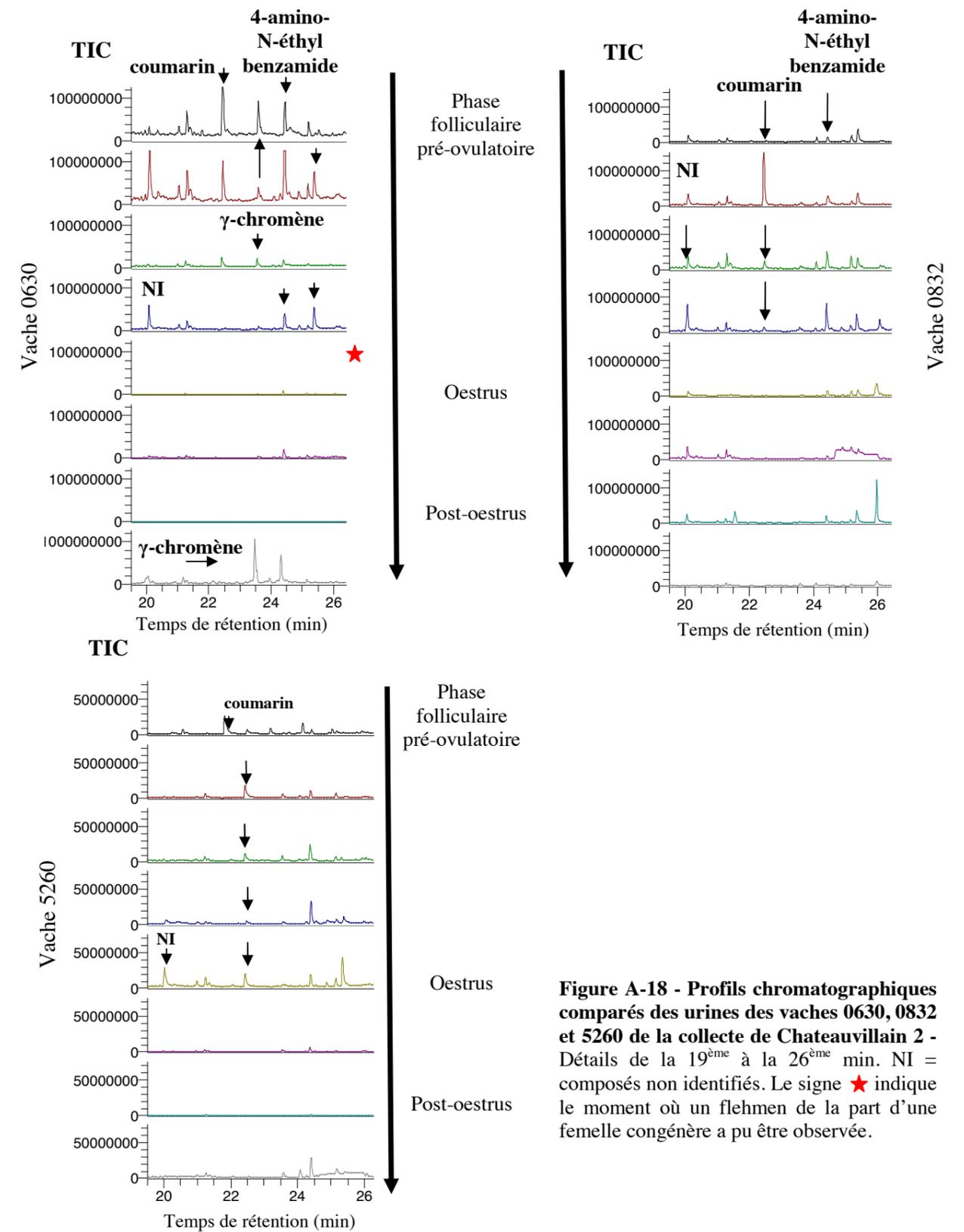


Figure A-18 - Profils chromatographiques comparés des urines des vaches 0630, 0832 et 5260 de la collecte de Chateauvillain 2 - Détails de la 19^{ème} à la 26^{ème} min. NI = composés non identifiés. Le signe ★ indique le moment où un flehmen de la part d'une femelle congénère a pu être observée.

Type de chaleurs		Absence de chaleurs	Chaleurs classiques				Chaleurs prolongées
Référence de la vache		0832	0630	0631	4248	5644	5260
Rt (min)	Composé identifié						
6.83	DMSO ₂	(PO) (O) (DO)		(PO) (O) (DO)	(PO) (O) (DO)		
17.81	3, 3, 4 triéthyl decane	(O)					
20.09	Bicyclo-[3,10]-hexane-3-one	(PO) (O)	(PO)				(O)
21.30	NI		(PO)				
22.45	2H-1 benzopyran-2-one (coumarin)	(PO)	(PO)	(O)	(PO) (O)	(PO) (O)	(PO) (O)
23.49	2,5,5,6,1a-pentaméthyl-cis-1a,4a,5,6,7,8 hexahydro-γ-chromène		(PO) (DO)		(O) (DO)		
24.40	NI	(PO) (O) (DO)	(PO) (DO)				(PO) (O) (DO)
25.37	4-amino-N-éthyl benzamide	(O)	(PO) (DO)	(O)	(PO) (O)	(PO)(O) (DO)	(O)
29.50	3-methyl-4,7-dioxo-ovt-2-enal					(DO)	
31.23	ficusine	(O)				(O)	
32.23	(2-aminophenyl)(pyrrolidixamyl) méthane					(O)	
33.40	6-aminoundecane	(PO)	(PO)		(PO) (O)	(PO)	(PO) (O) (DO)
38.18	Dérivé du naphthalène					(O)	

Tableau A-7 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les vaches de la collecte « Châteauvillain 2 » après extraction par DCM. (PO) = Stade pré-oestrus, (O) = Oestrus, (DO) = Di-oestrus, NI = composé non identifié.

Rt (min)	Composé identifié	PO	O	DO
6.83	DMSO ₂	3/6	3/6	3/6
17.81	3, 3, 4 triéthyl decane	0/6	1/6	0/6
20.09	Bicyclo-[3,10]-hexane-3-one	2/6	2/6	0/6
21.30	NI	1/6	0/6	0/6
22.45	2H-1 benzopyran-2-one (coumarin)	5/6	4/6	0/6
23.49	2,5,5,6,1a-pentaméthyl-cis-1a,4a,5,6,7,8 hexahydro-γ-chromène	1/6	1/6	2/6
24.40	NI	3/6	2/6	2/6
25.37	4-amino-N-ethyl benzamide	3/6	5/6	2/6
29.50	3-methyl-4,7-dioxo-ovt-2-enal	0/6	0/6	1/6
31.23	ficusine	0/6	2/6	0/6
32.23	(2-aminophenyl)(pyrrolidixamyl) methane	0/6	1/6	0/6
33.40	6-aminoundecane	5/6	2/6	1/6
38.18	Dérivé du naphthalène	0/6	1/6	0/6

Tableau A-8 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé en fonction du stade du cycle. NI = composés non identifiés, (PO) = Stade pré-oestrus, (O) = Oestrus, (DO) = Di-oestrus.

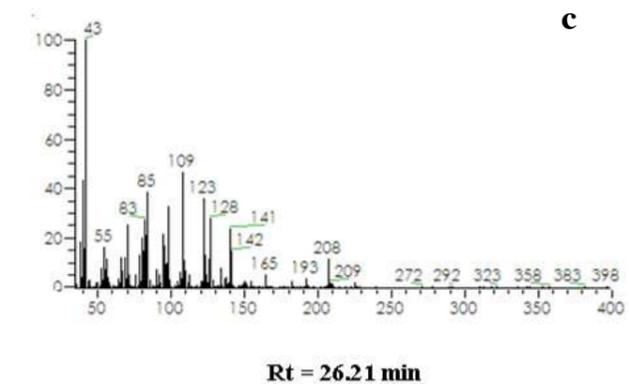
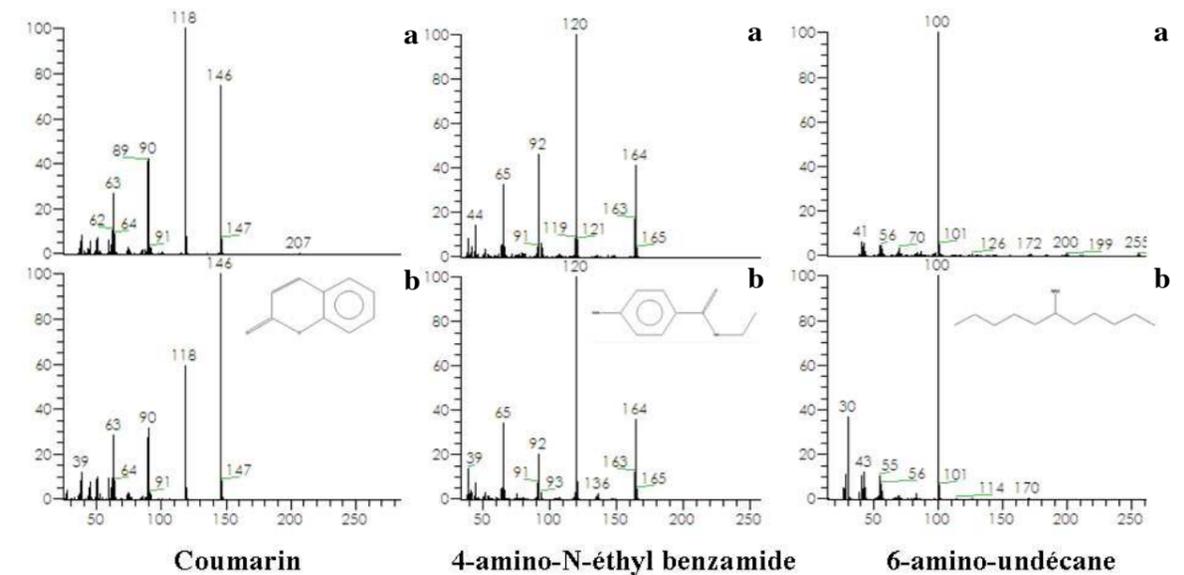


Figure A-19 - Composés identifiés comme spécifique des stades pré-oestrus et/ou oestrus chez une majorité de vaches lors de l'analyse des urines collectées lors de la session « Châteauvillain 2 ». Spectres de masses obtenus (a) comparés avec les spectres de référence de la banque NIST (b), spectre de masse du composé Rt = 26, 21 non identifié (c).

A-II-1-2 - Etude de la variabilité de la composition chimique des urines au cours du cycle oestral chez des vaches non superovulées - « Châteauvillain 2 » (Octobre 2007)

Le γ -chromène et le composé NI « Rt = 23,71 » apparaissant 10 à 16 h avant l'oestrus présumé dans les urines des vaches superovulées ne sont pas spécifiques du stade oestrus. Le γ -chromène a été retrouvé ici dans les urines de deux vaches tout au long du cycle (Figure A-18; Tableaux A-7 et A-8). Une recherche du composé Rt = 23,71 *via* ses ions caractéristiques (43/93/108/122/206/210) n'a pas permis de le retrouver dans les urines des vaches de cette collecte.

En revanche, d'autres composés ont pu être identifiés comme spécifiques de stades dont deux de façon spécifique de l'entrée en oestrus chez une majorité des vaches (Tableaux A-7 et A-8). Ainsi, la 2H-benzopyranone (ou **coumarin**) est présent chez l'ensemble des vaches aux stades pré-oestrus/oestrus (Figure A-16 ; tableaux A-7 et A-8). Le **6-amino-undécane** est présent de façon transitoire au stade pré-oestrus/oestrus chez quatre des six vaches. On notera que cette molécule est retrouvée tout au long des collectes chez la vache 5260, vache ayant montrée des chaleurs prolongées. Le 4-amino-N-éthyl benzamide est la troisième molécule variant nettement et présente chez l'ensemble des vaches, mais elle est retrouvée de façon aléatoire. D'autres composés ont été retrouvés de façon spécifique en fonction du stade mais chez un nombre restreint d'animaux, voire chez une seule vache, la 5644 (**3, 3, 4 triéthyl decane, bicyclo-[3, 10]-hexane-3-one, ficusine**). Les spectres de masse de ces composés sont présentés dans la figure A-19.

Lors de cette collecte, une vache d'une stabule adjacente (vache de race charolaise d'un autre programme-OPU) avait montré un intérêt particulier pour la vache 0630. Au matin du troisième jour, celle-ci avait reniflé à plusieurs reprises l'arrière-train de la vache 0630. En début d'après-midi, un flehmen avait pu être observé suite à une série de reniflements. Quelques minutes après le flehmen, la vache 0630 a uriné. Cette urine ne contient aucun des composés identifiés variant au cours du cycle. Les composés variant chez cette vache sont uniquement retrouvés dans les urines collectées précédentes (Figure A-18). Peut-être la vache congénère a-t-elle détecté des signaux non extraits ici.

Collecte « Châteauvillain 3 »

Tableaux de synthèse des composés identifiés dans les urines
 Comparaison des profils chromatographiques

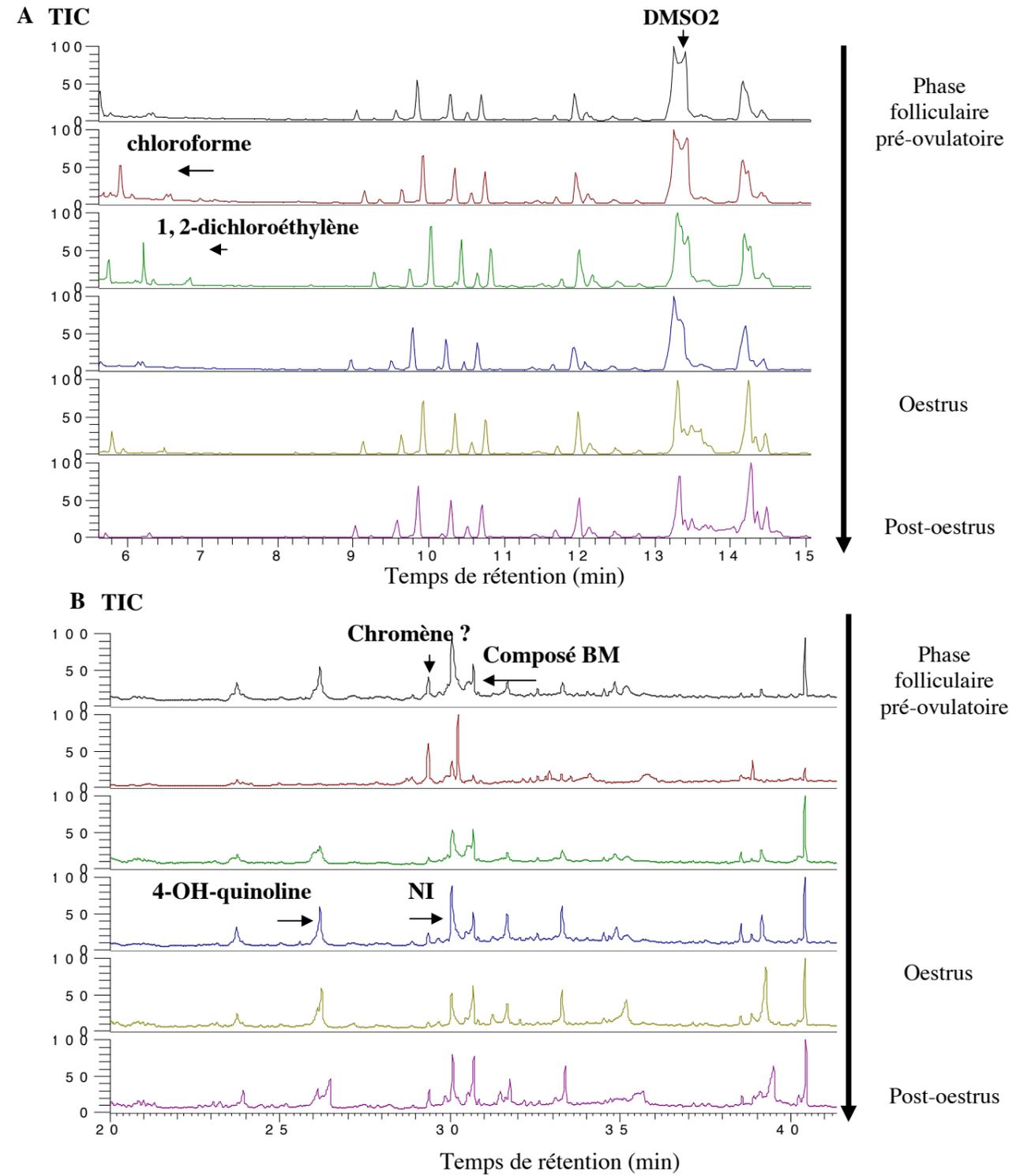


Figure A-20 - Profils chromatographiques comparés des urines des vaches 0631 de la collecte de Chateauvillain 2 - (A) Détail de la 5,7^{ème} à la 15^{ème} min, (B) Détail de la 20^{ème} à la 41^{ème} min. NI = composés non identifiés. NI = composé non identifié, composé BM = le 4-méthyl bis phénol.

Type de chaleurs		Absence de chaleur		Chaleurs classiques				Chaleurs tardives	
Référence de la vache		0832	4164	0630	0631	4248	5644	5260	6105
Rt (min)	Composé identifié								
5.73	1,2-dichloro éthylène		(PO) (O)		(PO) (O)	(PO) (O)	(PO)		
8.53	Toluène					(PO)(O) (DO)			(PO)(O) (DO)
13.23	DMSO ₂	(PO)(O) (DO)	(PO)(O) (DO)	(PO)(O) (DO)	(PO)(O) (DO)	(PO)(O) (DO)	(PO)(O) (DO)	(PO)(O) (DO)	(PO)(O) (DO)
14.08	(E)-3-méthyl-2-nonène			(O)					
18.54	4-méthyl phénol					(PO)	(PO)(O)		
23.93	2-éthyl-2-méthyl succinimide				(PO)(O)(DO)	(O)	(PO) (O)		
26.30	Coumarin					(O)			
29.53	NI (proche du chromène)	(PO)(O) (DO)	(PO)(O) (DO)	(PO)(O) (DO)	(PO)(DO)	(PO)(O) (DO)	(PO)(O) (DO)	(PO)(DO)	(PO)(DO)
30.77	4-méthyl bis phénol	(PO)(O) (DO)			(PO)(DO)		(PO)(DO)	(PO)(DO)	
35.58	4-OH quinoline				(O)(DO)			(PO)(O) (DO)	(O)(DO)
54.55	squalène				(PO)				

Tableau A-9 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les vaches de la collecte « Châteauvillain 3 » après extraction par DCM. (PO) = Stade pré-oestrus, (O) = Oestrus, (DO) = Di-oestrus, NI = composé non identifié.

Rt (min)	Composé identifié	PO	O	DO
5.73	1,2-dichloro éthylène	4/8	3/8	0/8
8.53	Toluène	2/8	2/8	2/8
13.23	DMSO ₂	8/8	8/8	4/8
14.08	(E)-3-méthyl-2-nonène	0/8	1/8	0/8
18.54	4-méthyl phénol	2/8	1/8	0/8
23.93	2-éthyl-2-méthyl succinimide	2/8	3/8	1/8
26.30	Coumarin	0/8	1/8	0/8
29.53	NI (proche du chromène)	8/8	5/8	8/8
30.77	4-méthyl bis phénol	4/8	1/8	4/8
35.58	4-OH quinoline	1/8	3/8	3/8
54.55	squalène	1/8	0/8	0/8

Tableau A-10 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé en fonction du stade du cycle. NI = composés non identifiés, (PO) = Stade pré-oestrus, (O) = Oestrus, (DO) = Di-oestrus.

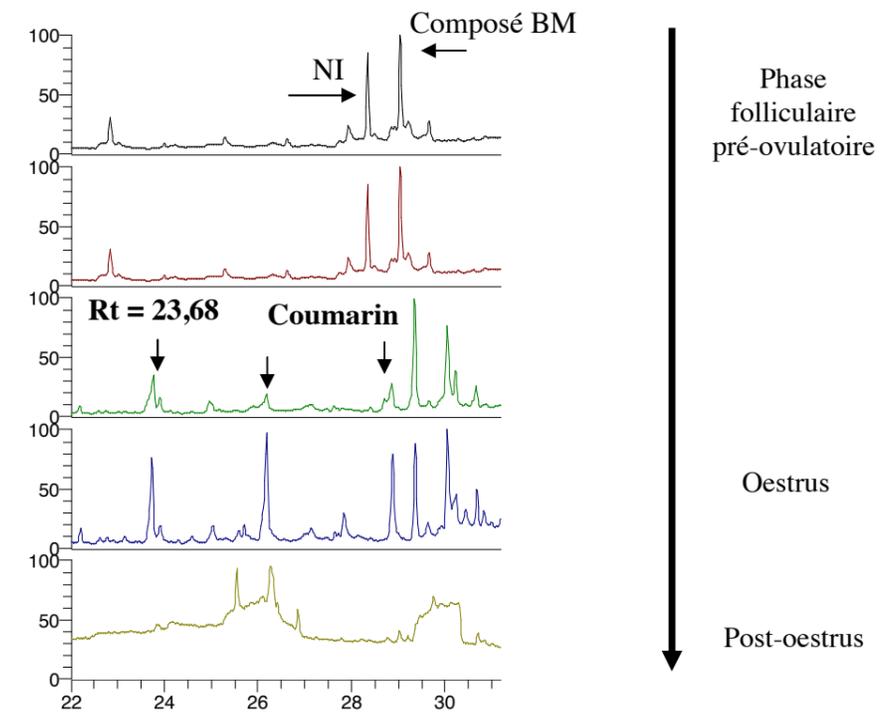


Figure A-21 - Profils chromatographiques comparés des urines de la vache 4248 – Détail de la 22^{ème} à 32^{ème} min. Détail des chromatogrammes montrant la présence du coumarin dans les urines de la vache 4248 au moment de l'oestrus. On remarquera dans les chromatogrammes présentés un léger décalage dans les temps de rétention des composés NI et BM au cours du cycle. Ceci est dû à un problème de splitless. NI = composé non identifié, composé BM = 4-méthyl bis phénol

A-II-1-3 - Etude de la variabilité de la composition chimique des urines au cours du cycle oestral chez des vaches non superovulées - « Châteauvillain 3 » (Mai 2007)

Les profils chromatographiques des urines extraites au cours de cette collecte sont différents des précédents. Pour un protocole d'extraction identique, moins de composés ont été extraits, notamment en ce qui concerne la série d'hydrocarbures présente dans les urines des deux collectes précédentes. Un certain nombre de composés varient chez l'ensemble des vaches de façon non spécifique. Ces composés sont présents en faible proportion.

Le **coumarin**, composé identifié comme spécifique de l'oestrus lors de la collecte précédente a été retrouvé chez une seule des huit vaches, la vache 4248 et ceci dans l'urine de stade oestrus, collectée 12 heures avant le pic de LH plasmatique. Il faut noter que cette vache a montré des chaleurs classiques apparaissant 48 heures après la 2^{nde} injection de PGF2 α . La DMSO₂ est encore présente de façon variable au cours du cycle mais toujours de façon non spécifique du stade oestrus. Le **4-méthyl phénol**, spécifique des urines de bufflesse en oestrus (Rajananarayanan, 2004), est présent ici aux stades pré-oestrus/oestrus chez deux vaches (Figures A-20, A-21, tableaux A-9 et A-10).

A-II-2 - Etude de la variabilité de la composition chimique des mucus vaginaux au cours du cycle oestral lors des collectes réalisées à la station expérimentale de Châteauvillain

Les profils chimiques des mucus vaginaux collectés au cours des trois collectes réalisées à la station expérimentale de Châteauvillain sont semblables (Exemple de la vache 4248 - Figure A-22). La présence de **DMSO₂**, de **l'acide 9-octadécénoïque** ainsi qu'une série d'**hydrocarbures** est observée dans l'ensemble des mucus vaginaux (en proportion variable selon la collecte et l'animal considéré, Figure A-23). Toutefois quelques composés supplémentaires sont observés dans les mucus de certaines vaches. Globalement, il y a moins de composés dans les mucus vaginaux de la troisième collecte (le même phénomène avait été observé pour les urines de cette même collecte).

Collectes « Châteauvillain 1, 2, 3 »
Analyse des mucus vaginaux

Tableau récapitulatifs des composés identifiés
 Chromatogrammes comparés
 Spectres de masse des composés identifiés

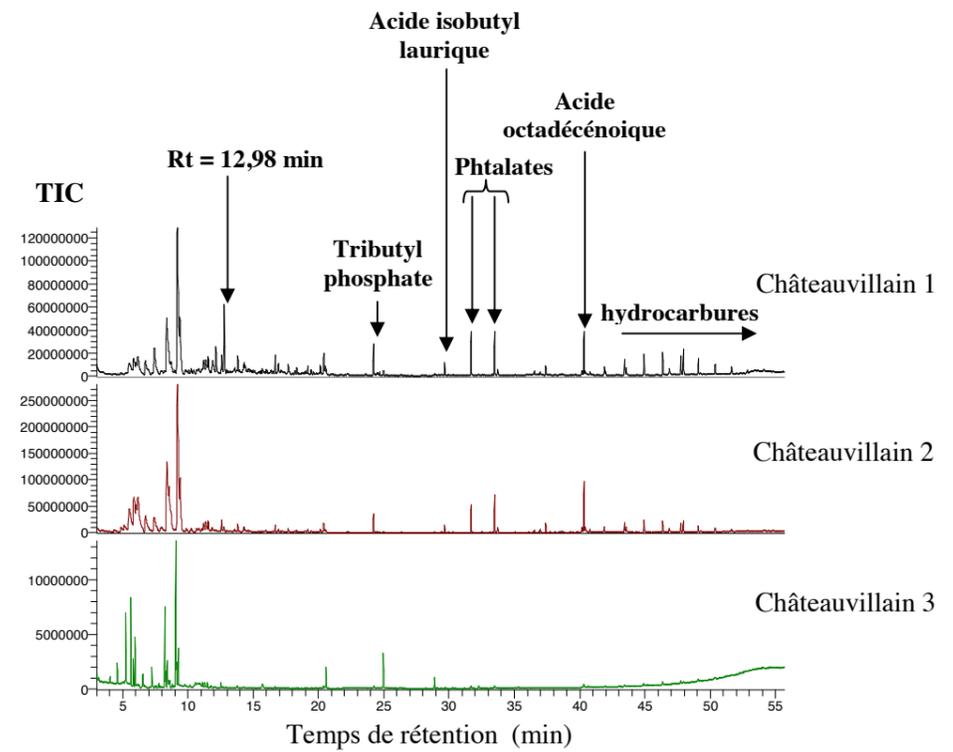


Figure A-22 - Profils chromatographiques comparés des mucus vaginaux sur les trois collectes réalisée à Châteauvillain – Exemple de la vache 4248.

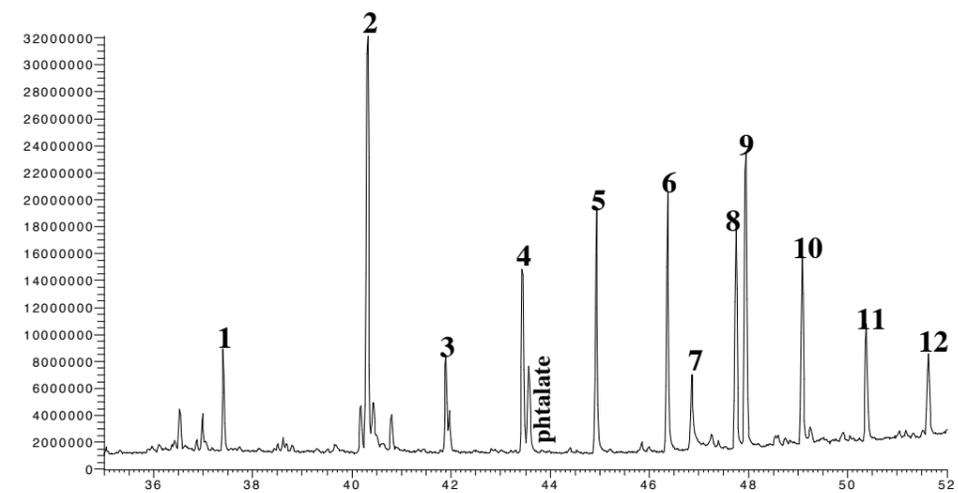


Figure A-23 - Détail d'un chromatogramme présentant les hydrocarbures et acides gras présents dans les mucus vaginaux des vaches collectées à la station expérimentale de Châteauvillain. Les composés référencés sont détaillés dans le tableau 11.

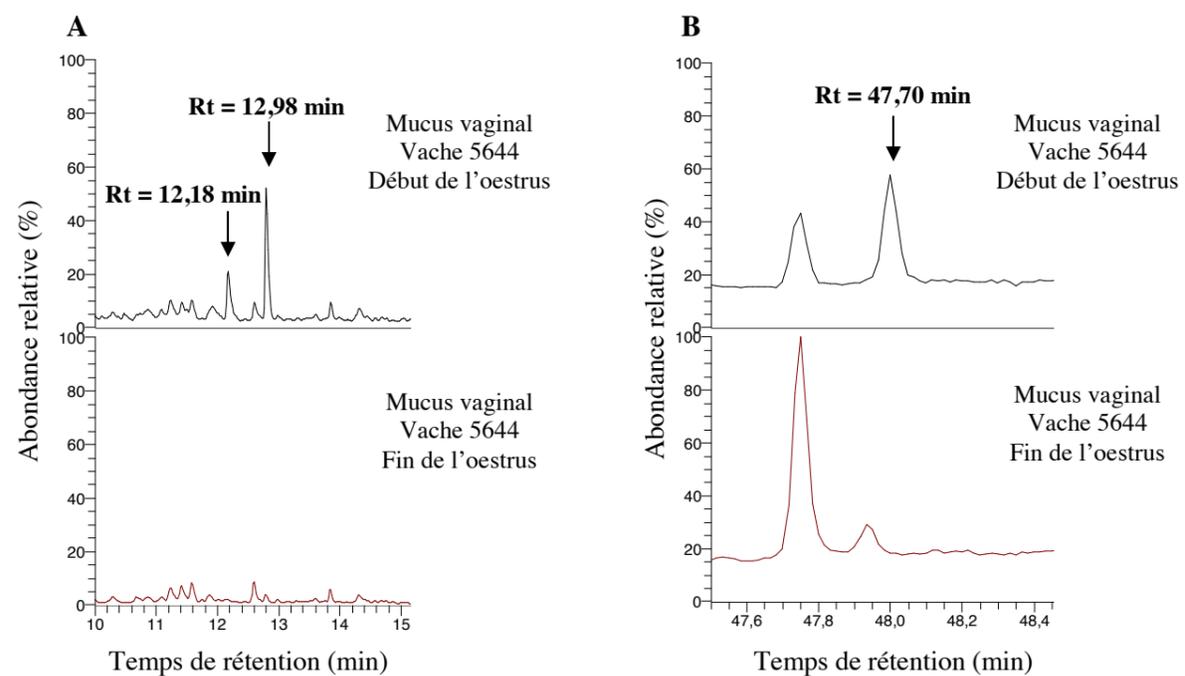


Figure A-24 - Profils chromatographiques comparés des mucus vaginaux de la vache 5644 au cours de l'oestrus lors de la collecte « Châteauvillain 1 ». (A) Détail de la 10^{ème} à la 15^{ème} min, (B) Détail de la 47,5^{ème} à la 48,4^{ème} min.

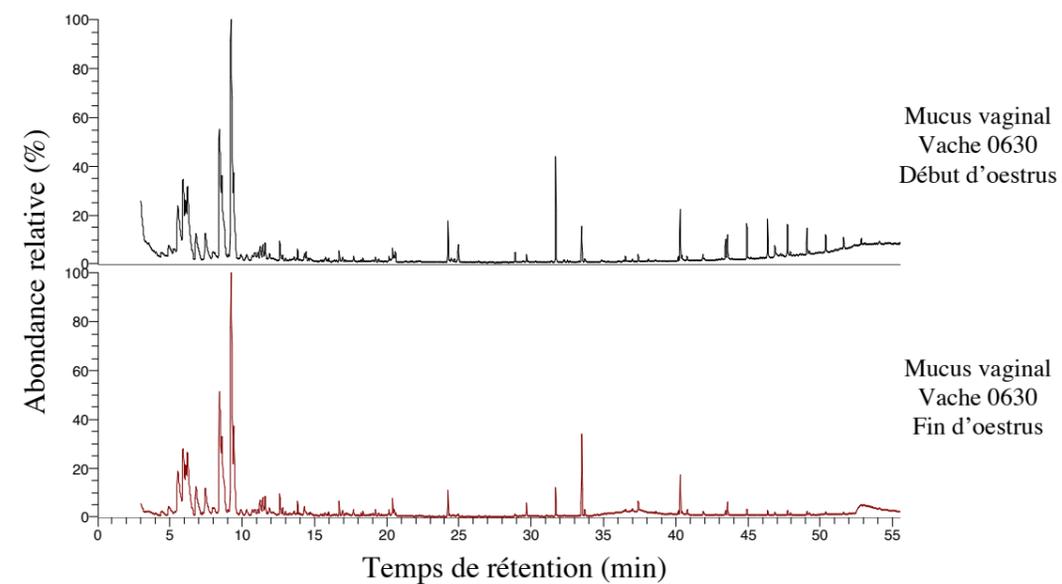


Figure A-25 - Profils chromatographiques comparés des mucus vaginaux de la vache 0631 au cours de l'oestrus lors de la collecte « Châteauvillain 2 ».

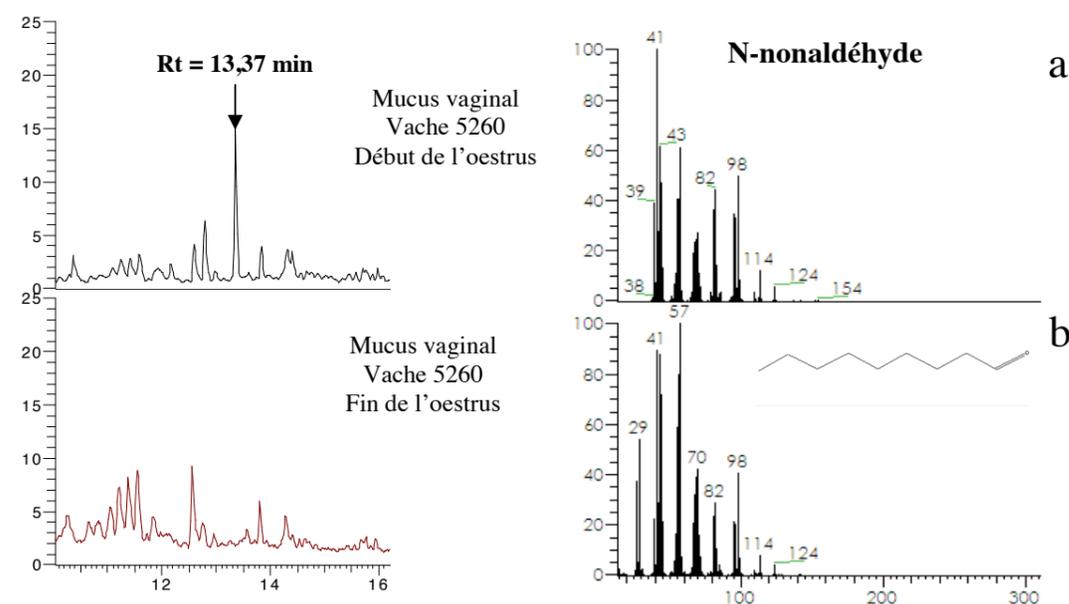


Figure A-26 - Composés spécifiques du mucus vaginaux de la vache 5260 lors de la collecte « Châteauvillain 3 » - (A) Détail de la 10^{ème} à la 16^{ème} min, (B) Spectres de masses obtenus (a) comparés avec les spectres de référence de la banque NIST (b).

A-II-2-1 - Analyse comparée des mucus vaginaux des vaches superovulées de la collecte « Châteauvillain 1 »

Pour certaines vaches, deux collectes de mucus vaginal ont pu être réalisées à un jour d'intervalle soit en début et en fin d'oestrus (0631 et 5644). Des variations de profils sont observés uniquement pour la vache 5644, vache ayant exprimée des chaleurs longues, avec la présence de façon spécifique en début d'oestrus de trois composés : $Rt = 12,18$, $Rt = 12,98$ et $Rt = 47,70$. Le composé $Rt = 12,98$ est retrouvé dans le mucus vaginal de la vache 4248 collecté en début d'oestrus.

A-II-2-2 - Analyse comparée des mucus vaginaux des vaches non superovulées des collectes « Châteauvillain 2 » et « Châteauvillain 3 »

Les profils chromatographiques des mucus vaginaux collectés au cours de ces deux collectes sont similaires entre eux et semblables à ceux obtenus lors de l'analyse de la collecte « Châteauvillain 1 ». Pour les vaches sur lesquelles plusieurs échantillons de mucus vaginal ont pu être collectés, une diminution de la proportion relative des acides gras présents est observée (aire des pics de 3 à 5 fois plus faible) pour les mucus vaginaux de fin d'oestrus.

On notera la présence spécifique de l'acide laurique isobutyl ester dans les mucus vaginaux collectés en début d'oestrus chez la vache 0631 lors de la collecte « Châteauvillain 2 ». De même, le mucus vaginal de la vache 5260 de la collecte « Châteauvillain 3 » contient du n-nonaldéhyde en début d'oestrus exclusivement. Ce composé n'a pas été retrouvé dans les mucus vaginaux des vaches collectées en même temps, ni dans ceux de la collecte « Châteauvillain 2 ».

A-II-3 - Hétérogénéité des variations chimiques des urines des vaches collectées à la station expérimentale de Châteauvillain

Au cours des trois collectes réalisées à Châteauvillain, une grande hétérogénéité dans la composition des urines est observée au sein d'une collecte entre les animaux collectés sur la même période comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents (tableaux 6, 8 et 10). Mais une hétérogénéité est également observée pour un même animal sur les trois collectes réalisées. Ainsi les vaches 0631, 4248, 5260 et 5644 qui ont été collectées au cours des trois sessions ne montrent pas de variations systématiques.

Numéro du composé	Rt (Min)	Composé identifié
1	37,44	Acide hexadécanoïque 2-méthylpropyl ester
2	40,31	Acide 9-octadécénoïque
3	41,92	n-tetracosane
4	43,40	n-pentacontane
5	44,66	n-hexacosane
6	46,01	n-heptacosane
7	46,84	(Z)-13-docasenamide
8	47,69	n-octacosane
9	47,96	Squalène
10	49,09	n-triacontane
11	50,39	n-tetratriacontane
12	51,62	n-tetratetracontane

Tableau A-11 - Liste des hydrocarbures identifiés dans les mucus vaginaux des collectes « Châteauvillain ».

La présence de signaux chimiques étant dépendante du cycle de la femelle qui est lui-même complètement sous régulation hormonale, nous espérons observer des variations chimiques plus intenses. L'apparition de ces composés lors de la précédente collecte de façon concomitante à l'approche de l'oestrus n'était peut-être qu'une coïncidence et lié au changement d'environnement des animaux. En effet, les animaux étaient retirés du pâturage la veille du début des collectes. Ces composés peuvent correspondre à de nouveaux produits du métabolisme résultant d'un changement d'alimentation mais aussi d'une hydratation accrue. Au cours de cette collecte deux composés majoritaires sont présents de façon spécifique de la phase folliculaire pré-ovulatoire, le **coumarin** et le **6-amino-undécane**. Les résultats obtenus à la suite de l'analyse des collectes réalisées à la station expérimentale montrent des profils qui varient différemment pour les vaches surperovulées et les vaches non superovulées. Une troisième collecte a été réalisée de façon à confirmer les résultats obtenus sur des vaches synchronisées non superovulées.

Collecte « Nouzilly 3 »

Tableaux de synthèse des composés identifiés dans les urines de génisses

Comparaison des profils chromatographiques

Structure chimique et spectres ionique des composés identifiés

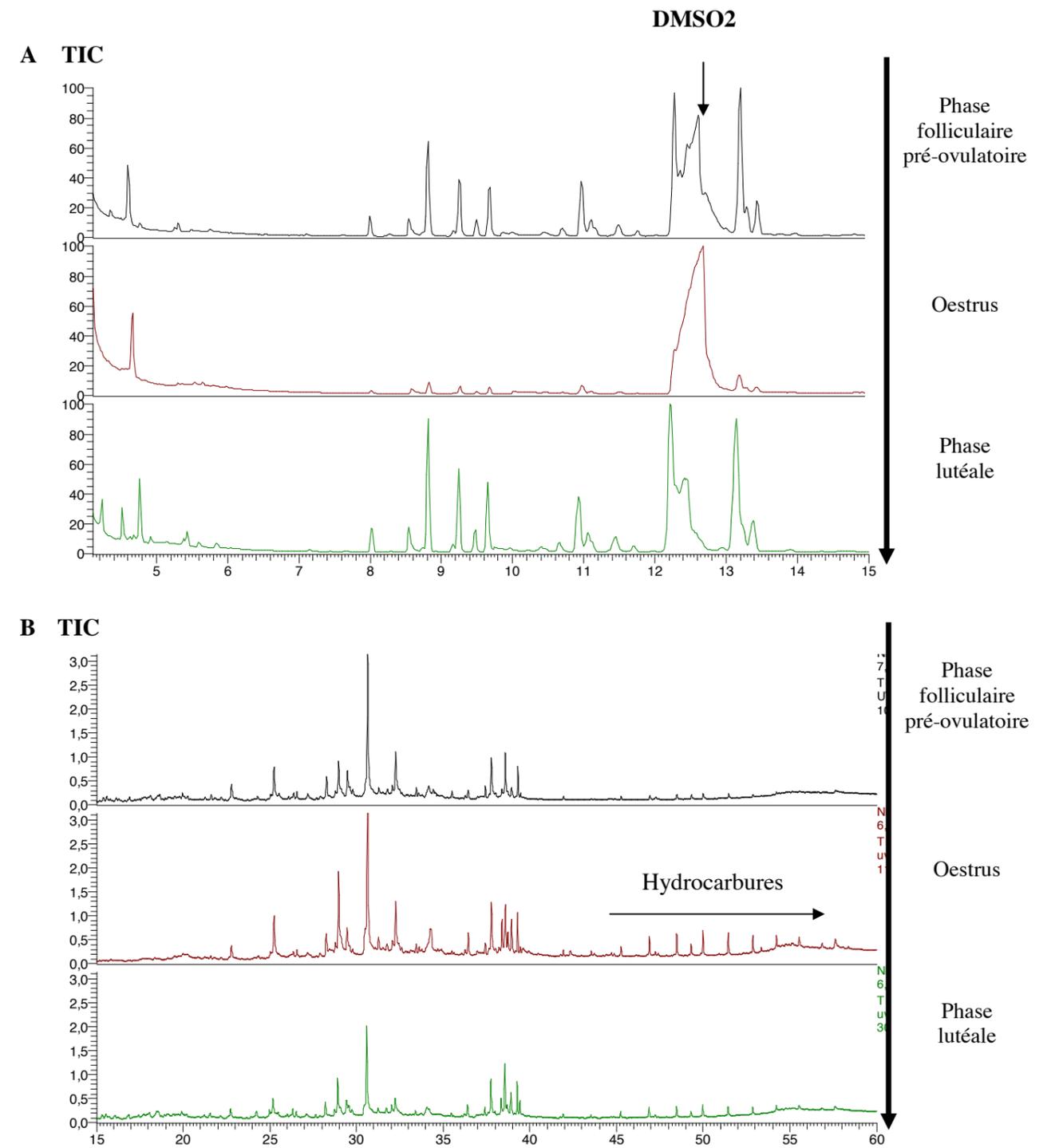


Figure A-29 - Profils chromatographiques comparés des urines de génisses au cours d'un cycle – Exemple de la génisse 1920. (A) Détail de la 4^{ème} à la 15^{ème} min, (B) Détail de la 15^{ème} à la 60^{ème} min.

Rt (min)	Composé identifié	Génisses ayant été collectées pour les trois stades				Génisses ayant été collectées Pour 1 ou 2 stades			
		1920	4160	7835	9052	1935	2098	3465	4810
4.25	1,2 dichloro éthylène	(PL)							
4.50	2-butanone	(PL)							
12.43	Diméthyl sulfone	(O)							
30.69	4-amino-N-éthyl benzamide		(O)(PL)						(PO)
34.00	2-hydroxyquinolone	(O)			(PL)				
39.45	NI	(PO)(O)		(PO)(O)					
42.33	palmitonitrile	(O)	(PO)			(O)			
47.33	NI			(O)					
53.55	squalène	(O)				(O)			
56.88	tetracontane	(O) (PL)							

Tableau A-13 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les génisses de la collecte « Nouzilly 3 » après extraction par DCM. (PO) = Stade pré-oestrus, (O) = Oestrus, (PL) = Phase lutéale. NI = composés non identifiés

Rt (min)	Composé identifié	PO	O	PL
4.25	1,2 dichloro éthylène	0/8	0/8	1/8
4.50	2-butanone	0/8	0/8	1/8
12.43	Diméthyl sulfone	0/8	1/8	0/8
30.69	4-amino-N-éthyl benzamide	1/8	1/8	1/8
34.00	2-hydroxyquinolone	0/8	1/8	1/8
39.45	NI	2/8	2/8	0/8
42.33	palmitonitrile	1/8	2/8	0/8
47.33	NI	0/8	1/8	0/8
53.55	squalène	0/8	2/8	0/8
56.88	tetracontane	0/8	1/8	1/8

Tableau A-14 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vache présentant les mêmes variations pour un composé en fonction du stade du cycle. NI = composés non identifiés.

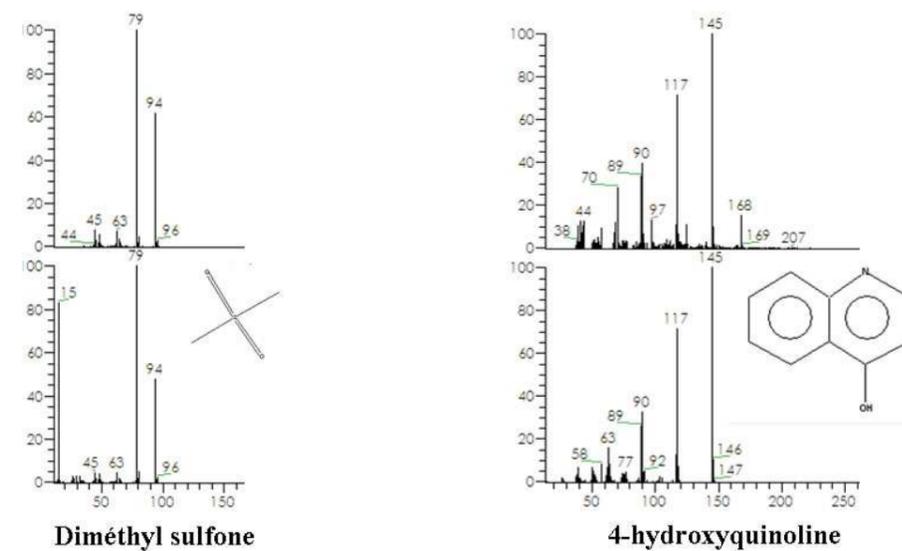


Figure A-29 - Composés identifiés de façon spécifique de l'oestrus chez les génisses collectées.

A-III - Etude comparative des profils urinaires de génisses au cours d'un cycle oestral (collecte "Nouzilly 3")

L'identification de signaux chimiques impliqués dans la détection de l'oestrus chez des génisses (vache n'ayant pas encore vêlé et ayant moins de 18 mois) de race Prim'Holstein au cours de leurs 1^{ers} cycles oestral a également été entreprise. Les collectes d'urines ont été réalisées à raison de trois collectes par cycle : en pré-oestrus (ici défini comme 3 jours avant l'oestrus), en œstrus et en phase lutéale de façon non invasive. Les extractions de composés chimiques ont été effectuées selon le protocole utilisé pour l'analyse des urines collectées à la station expérimentale de Châteauvillain. La seule différence réside dans la phase de concentration sous azote qui a été plus importante. En effet, les premières analyses par GC/MS ont montré la présence de très faible quantité de composés après la première concentration au 1/100^{ème}. Une seconde concentration a donc été réalisée pour arriver à une concentration finale de la solution extraite au 1/1000^{ème}.

Quelque soit l'animal, très peu de composés sont visibles malgré la seconde étape de concentration (Tableau A-11). La présence de composés en faible quantité dans ces urines peut être due au mode de conservation au moment de la collecte et surtout au délai avant congélation, ou au moment de l'extraction chimique. L'évaporation de composés chimiques a pu avoir lieu à chacune de ces étapes. Les profils chimiques urinaires sont semblables d'une vache à l'autre sans qu'une variation nette soit observée au cours du cycle. Les composés qui varient se trouvent en très faibles proportions dans les urines (proche du bruit de fond). Seule, la **DMSO₂** voit sa proportion nettement augmenter (aire du pic 10 fois plus importante) au stade œstrus, mais ceci uniquement chez une seule génisse, la génisse 1920. Chez les autres génisses, la DMSO₂ est retrouvée de façon systématique aux trois stades étudiés et ceci en proportion similaire, comparable à celle observée aux stades pré-oestrus et phase lutéale de la génisse 1920. Trois autres composés sont retrouvés de façon spécifique de stades pré-oestrus et/ou œstrus (selon les animaux) : **le palmitonitrile, le squalène et un dernier composé non identifié (Rt = 39.45 min)**. Le **squalène** est également retrouvé chez la génisse 1935 également de façon spécifique de l'oestrus. Ce composé avait été retrouvé lors de l'analyse des urines de "Nouzilly 2" chez plusieurs vaches (Tableau A-1) et sa diminution ou sa disparition était observée lors de l'oestrus. La **2-butanone** présente uniquement chez cette génisse avait également été décrite dans les urines et mucus vaginaux de vache de réformes de Nouzilly de façon non spécifique du stade œstrus.

Variabilité interindividuelle

L'ensemble des travaux réalisés révèle une **grande hétérogénéité** dans les résultats obtenus. Ainsi, d'une collecte à l'autre, donc d'un groupe d'animaux à l'autre, la composition chimique des urines et des mucus vaginaux varie. Pour des conditions similaires de traitement et un même animal, les composés présents aux stades pré-oestrus et/ou oestrus sont différents d'un groupe d'animal à l'autre. Cette absence de continuité dans les résultats obtenus peut s'expliquer en partie par l'hétérogénéité des lots d'animaux étudiés : type d'animaux (vaches de réformes ou génisses), lieu de collecte (Nouzilly (INRA, Tours) et Châteauvillain (UNCEIA)) et donc expérimentateurs, saison de collecte (printemps et automne), traitements hormonaux (synchronisation ou non, superovulation ou non). A cela, il faut ajouter le facteur stress induit par la modification de l'environnement direct (présence d'étrangers) et du mode de vie des animaux (immobilisation des animaux à des horaires précis et sur de longues périodes, prises de sang et échographies régulières). L'ensemble des collectes a été réalisé sur des vaches de réformes « taries », ce qui signifie qu'elles ne produisent plus de lait, mais rien n'indique dans la littérature que cela puisse avoir un effet sur la production de médiateurs chimiques.

La question de la collecte en phase lutéale 7 jours après la synchronisation des animaux peut-être remise en cause par les suivis de cycle réalisés lors de la troisième collecte à Châteauvillain. En effet, nous avons pu constater par suivi échographique que l'ovulation n'avait pas lieu de façon systématique chez les vaches, même si elles montraient des signes manifestes de chaleurs similaires et simultanés. Chez des vaches montrant des signes de chaleurs externes (augmentation de l'agitation, agressivité, présence de mucus), l'ovulation pouvait être observée avec des décalages d'une journée (Annexe 3A et 3B) et avoir lieu au dernier jour de collecte, soit 5 jours après la synchronisation. La distinction entre les stades n'a donc pas toujours reflété l'état physiologique réel des animaux, ce qui rend délicate l'interprétation de la présence ou de l'absence d'un composé à un stade donné.

Notre stratégie d'analyse individuelle des urines, par comparaison avec les analyses de pools réalisés par d'autres auteurs, a révélé une importante variabilité interindividuelle. En effet, quelque soit la collecte considérée, hormis les quelques composés variant au moment des stades pré-oestrus et/ou oestrus chez une majorité de vaches, d'autres composés sont

identifiés comme spécifiques de ces stades chez d'autres vaches. Il semble évident qu'un pool d'urine ne va faire ressortir que les composés majoritaires et va gommer les différences interindividuelles. De plus, les pools réalisés sur la bufflesse par exemple, ont subi une concentration très importante avant l'analyse par GC-MS (Rajananarayanan, 2004), ce que nous sommes refusés à réaliser car l'évaporation non contrôlée sous flux gazeux peut entraîner la perte des composés les plus volatils.

Cette hétérogénéité entre les animaux reflète la difficulté à déterminer précisément le moment des chaleurs chez les vaches laitières d'élevages, qui se caractérisent par une grande variabilité interindividuelle, aussi bien au niveau comportemental que dans la composition chimique des urines. A ce titre, il est important de souligner que les deux variabilités ne sont pas forcément liées chez le même animal: autrement dit, une vache présentant des signes manifestes et marqués de chaleurs ne produira pas nécessairement beaucoup de composés chimiques dans ses urines, et vice-versa. Cet élément a des conséquences importantes pour l'interprétation de nos résultats. En effet, un composé donné sera peut-être un marqueur de l'oestrus, même s'il n'est pas présent chez toutes les vaches et même si sa présence n'est pas restreinte au stade oestrus. Seuls les tests comportementaux utilisant ces composés, seuls ou en mélange, pourront valider ou invalider leur effet biologique. Il est donc important de ne négliger aucun des composés identifiés lors de la poursuite de ces travaux.

Identification de signaux chimiques potentiels

Malgré l'absence de composés chimiques reliés de façon claire et systématique au stade oestrus, un certain nombre de molécules présentes de façon spécifique, ou dont la proportion varie significativement à un stade donné, ont pu être identifiées (Tableau X). Ces composés sont particulièrement intéressants puisqu'ils présentent les caractéristiques habituelles des médiateurs chimiques (structure chimique et propriétés physicochimiques). Certains d'entre eux sont même impliqués dans la communication chimique d'autres espèces, voire de la même espèce.

- le **γ -chromène** a été identifié de façon quasi systématique (chez 5 des 6 animaux) dans les urines des vaches superovulées en stade oestrus (Chateauvillain 1), apparaissant 10 à 16 heures avant l'oestrus présumé et perdurant chez certains des animaux jusqu'à la fin de l'oestrus. Ce composé a été identifié chez les mêmes animaux en absence de traitement de superovulation en phase lutéale (Chateauvillain 2).

- le **coumarin**, composé spécifique de l'oestrus ou pré-oestrus est largement présent dans les urines des vaches de la seconde collecte de Châteauvillain 2. Ce composé, associé à des lactones est un marqueur métabolique de l'espèce *Mus spicilegus*. En effet, ce composé est présent spécifiquement dans les urines de souris mâles castrés alors qu'il est absent chez les mâles de l'espèce de souris *Mus domesticus* (Soini *et al.*, 2009). La présence du coumarin chez *M. spicilegus* pourrait résulter de voies métaboliques différentes chez les deux espèces.

- le **6-amino-undecane** identifié chez deux animaux lors de la 2^{ème} collecte de Châteauvillain est proche de la structure chimique de l'1-iodoundecane identifié dans les urines et les fèces de vache en oestrus étudiées par l'équipe du Dr. Archunan (Ramesh Kumar *et al.*, 2000, Rameskar & Archunan, 2002, Sankar & Archunan, 2007).

- la dimethyl sulfone (**DMSO₂**) présente un intérêt particulier, bien qu'elle ait été identifiée dans toutes les collectes, de façon spécifique ou non. Ce composé est un produit dérivé du métabolisme, présent fréquemment dans les urines. Chez le hamster doré, le diméthyl-disulfure, de structure chimique très voisine, est contenu dans le mucus vaginal de la femelle, fluide qui attire le mâle. Une fois à proximité de la femelle, le mâle explore la zone péri-vaginale. L'aphrodisine, petite protéine du mucus vaginal aurait ensuite le pouvoir d'induire la monte de la femelle par le male.

- La quantité relative de **squalène** diminue ou disparaît au stade oestrus dans les urines collectées chez les vaches "Nouzilly 2". Le squalène est un terpène (polymère d'isoprène) présent en grande quantité dans l'huile de foie de requin et dans les huiles céréalieres. C'est le précurseur de la biosynthèse des stéroïdes chez l'animal, et des stérols chez les plantes. Les stérols sont des médiateurs chimiques impliqués dans la défense de la plante. Ils sont liés de manière plus ou moins spécifique par de petites protéines solubles, les élicitines, qui induisent les voies de transduction du signal (Lascombe *et al.*, 2008). Cette convergence intéressante entre plantes et animaux fait de ce composé un candidat intéressant comme marqueur de l'oestrus.

- le **4-méthyl phénol et l'acide 9-octadécénoïque** ont été identifiés dans les urines de bufflesse en chaleurs et induisent respectivement une augmentation du nombre de flehmens et la monte de la femelle chez le buffle (Rajananarayanan, 2004). Ils sont donc des signaux chimiques potentiels chez la vache. Le 4-méthyl phénol pourrait provenir des fèces dont il est un composant habituel chez la truie (Bourque *et al.*, 1987) ce qui expliquerait sa présence sporadique dans les urines. Par contre, le di-n-phthalate et l'1-iodoundecane identifiés comme

spécifiques de l'oestrus dans les urines de vache (Jersey) par Rameskar *et al.* (2000) n'ont pas été identifiés au cours de nos analyses.

- enfin, trois composés de temps de rétention 20,27, 21,10 et 23,71 min. n'ont pu être identifiés mais sont présents dans certaines urines de stade oestrus ou pré-oestrus.

Parmi tous ces composés, le coumarin, le 6-amino-undecane, le squalène vont être testés par présentation en coupelle (INRA, Tours) ou en spray à des taureaux (UNCEIA) afin d'observer les éventuels comportements induits, et en particulier évaluer leur activité « aphrodisiaque ».

Les mucus cervicaux

Notre stratégie initiale s'est focalisée sur l'urine, fluide biologique décrit le plus souvent pour être impliqué dans l'émission de marqueurs volatils de l'oestrus. Cependant, nous avons également collecté des mucus cervicaux, ce fluide n'étant sécrété qu'au moment de l'oestrus et dont l'activité stimulatrice de comportements sexuels a été rapportée.

Contrairement à la composition variable des urines, la composition des mucus cervicaux est remarquablement homogène entre les vaches, particulièrement pour les mucus issus de la collecte "Nouzilly 2". Parmi les composés identifiés, la **2-butanone** est présente de façon spécifique au stade pré-oestrus lors des collectes réalisées à Nouzilly et dans les mucus vaginaux de ces mêmes femelles. Dans les urines, la 2-butanone est associée au DMSO₂ qui présente des variations similaires. Sa quantité est maximale en phase pré-ovulatoire et décroît ensuite. Ce composé a déjà été identifié dans les urines de lion (*Panthera leo*) comme spécifique du mâle lorsqu'il est associé à une faible proportion d'acétone dans les urines (Andersen & Vulpius, 1999). Les mucus des trois collectes effectuées à Châteauvillain ont également une composition très homogène. Cependant, les composés identifiés sont différents de ceux présents dans les mucus de la collecte "Nouzilly 2". Les deux troupeaux concernent donc des vaches vivant ensemble, parfois depuis des années, dans un même environnement et consommant la même nourriture. Nous avons mentionné dans l'introduction que les médiateurs chimiques sont souvent issus du métabolisme secondaire et non pas synthétisés par des glandes spécialisées. Une même alimentation peut très bien produire des composés semblables chez les vaches d'un même troupeau, ce qui expliquerait l'homogénéité de la composition en mucus au sein d'un troupeau et les différences de composition constatées entre troupeaux. Dans ce cas, on peut imaginer que les femelles congénères reconnaissent cette odeur comme étant associée à l'oestrus au sein de leur troupeau, et que cette odeur peut

contribuer à la synchronisation des chaleurs. Cette hypothèse permettrait aussi d'expliquer pourquoi les mâles naïfs sont incapables d'identifier ces odeurs en tant que marqueurs de l'oestrus. La remarquable homogénéité des mucus cervicaux et la présence de médiateurs chimiques potentiels incite à orienter les études futures vers une caractérisation chimique et biologique approfondies de ce fluide biologique au sein de plusieurs troupeaux. Des tests comportementaux permettront aussi de déterminer si les mâles sont capables d'identifier ce mélange odorant en tant que signal sexuel, qu'ils soient naïfs ou pas, et selon leur parenté avec les vaches étudiées.

Chapitre B

Caractérisation des protéines de liaison

Les protéines de liaison

Les odeurs et les phéromones sont, pour la plupart, des molécules volatiles et hydrophobes véhiculées par l'air, de l'animal émetteur vers l'animal détecteur. Elles doivent être solubilisées dans leur milieu d'origine, ou dans les tissus olfactifs pour atteindre leur cible moléculaire. Deux types de protéines sont susceptibles de lier les odeurs et les phéromones selon qu'elles sont exprimées dans les **fluides émetteurs** ou dans les **tissus détecteurs** :

- les **protéines de transport**. Elles sont sécrétées dans les fluides qui contiennent les phéromones, tels que l'urine, les larmes ou la salive. Les protéines urinaires de souris et de rat, les MUP et l' α -U2-microglobuline (respectivement) sont produites et sécrétées par le foie avant d'être excrétées dans l'urine où elles lient des composés phéromonaux (Novotny *et al.*, 1999). Les MUP protègent le ligand phéromonal de la dégradation et permettent sa libération progressive dans le temps (Hurst *et al.*, 1998). Dans l'urine d'Elephant, l'albumine urinaire séquestre la phéromone sexuelle femelle, le Z7-12:Ac, jusqu'à sa libération au moment de l'oestrus, sous contrôle hormonal (Rasmussen, 2001). L'aphrodisine est un constituant de la décharge vaginale du Hamster femelle, elle contient des composés qui stimulent le mâle lors du comportement sexuel (Singer & Macrides, 1990). La SAL porcine est sécrétée par les glandes sous-maxillaires dans la salive du verrat. Ses ligands endogènes sont l'androsténol et l'androsténone, les composants de la phéromone sexuelle mâle. Les protéines ainsi décrites sont nommées pheromone-binding proteins (PBP), car leurs ligands endogènes ont été caractérisés en tant que phéromones par leur activité biologique. Dans certains cas, la protéine elle-même peut avoir une activité phéromonale. Ainsi, une des MUP de souris mâle est capable d'accélérer la puberté chez des femelles congénères (Mucignat-Caretta *et al.*, 1995).

- les **protéines détectrices**. Elles sont sécrétées par les glandes de Bowman de l'épithélium olfactif dans le mucus de la muqueuse respiratoire. Chez les mammifères, les **protéines de liaisons aux odeurs (OBP pour Odorant-Binding Proteins)** ont été découvertes lors de recherches visant l'identification de récepteurs olfactifs. Ainsi, au début des années 80, Pelosi *et al.* (1982) identifient un « récepteur » à la 2-isobutyl-3-[³H]methoxy-pyrazine (IBMP, odeur de poivron vert) dans les mucus olfactifs de bovin. Il s'avère que ce « récepteur » est une protéine soluble exprimée au niveau de l'épithélium olfactif. La protéine bovine de liaison aux odeurs (OBPb, Bignetti *et al.*, 1985) a ainsi été

caractérisée. Dans les années qui suivent la caractérisation de l'OBPb, de nombreuses autres OBP ont été caractérisées, chez le Porc, les rongeurs, l'Homme ou encore le xénope, animal amphibie. Les travaux chez le Xénope sont particulièrement intéressants car ils démontrent que l'OBP apparaît de façon simultanée avec la mise en place de la vie aérienne (Millery *et al.*, 2005). Ces protéines semblent donc résulter de l'adaptation à la vie aérienne. En effet, aucune OBP n'a été mise en évidence chez les poissons, où les phéromones sont des acides aminés, donc des molécules hydrosolubles.

Les lipocalines

L'ensemble de ces protéines, de transport et détectrices, appartient à la super-famille des **lipocalines**. Cette famille est composée de petites protéines, souvent extracellulaires, ayant la capacité de lier des molécules hydrophobes. Bien que les lipocalines partagent des motifs de séquence conservés, dans l'ensemble leur niveau d'homologie est faible (entre 10 et 40%). En revanche, elles sont caractérisées par une même structure 3D formée de 8 feuillets β antiparallèles et d'une hélice α à l'extrémité C-terminale, liée au tonneau formé par les feuillets β par une boucle. L'hélice α est souvent suivie d'un 9^{ème} feuillet β (Grzyb *et al.*, 2005). Le tonneau central constitue une poche hydrophobe qui est le site de liaison des ligands de la protéine (Flower *et al.*, 2000). Ces protéines interviennent dans des processus physiologiques très différents, mais possèdent généralement une fonction commune de transporteur de composés hydrophobes tel que les vitamines, stéroïdes et produits métaboliques. Par exemple, la "retinol binding protein" (RBP) transporte le rétinol dans le sang (Goodman, 2006). De plus, certaines lipocalines ont un rôle plus spécifique intervenant dans des fonctions biologiques particulières telles que la régulation de la réponse immunitaire, la médiation de l'homéostasie cellulaire, mais aussi dans les processus olfactifs (Akerstrom, 2000).

Outre leur structure tridimensionnelle (3D), les lipocalines présentent un motif GXW conservé à l'extrémité N-terminale de leur séquence peptidique. Le tryptophane du motif GXW, présent chez toutes les OBP dans l'hélice α courte en position N-terminale, est localisé au fond de la poche hydrophobe. Il n'est généralement pas en contact avec la cavité ou le solvant. Une seconde séquence est conservée, YXXXYXG, au niveau du deuxième feuillet β des OBP, mais pas chez toutes les lipocalines (Tegoni *et al.*, 2000). Les OBP de mammifères se caractérisent aussi par la présence d'un pont disulfure conservé permettant le maintien de leur structure 3D. Les OBP sont généralement décrites sous forme de monomères, telle l'OBP

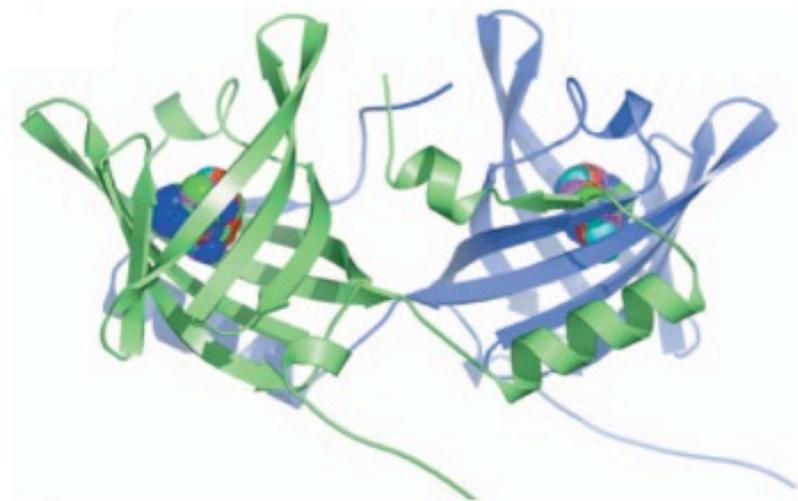


Figure B-1 - Représentation de la structure secondaire du dimère de l'OBPb avec un ligand dans chaque cavité. Les monomères A et B sont représentés respectivement en vert et en bleu. D'après Vincent *et al.*, 2004.

porcine (Vincent *et al.*, 2000). Certaines sont dimériques comme l'OBP-1 de rat (Nespoulous *et al.*, 2004) ou l'OBPb (Bianchet *et al.*, 1996 ; Tegoni *et al.*, 1996).

L'OBP bovine, une lipocaline particulière

L'OBPb, protéine majoritaire des tissus olfactifs bovins fait figure d'exception parmi les OBP. Bien que possédant de nombreuses caractéristiques des lipocalines et des OBP de mammifères en général, tels que la structure 3D en tonneau β , ou encore la présence de la séquence conservée GXW en position N-terminale, l'OBPb se distingue des autres OBP qui sont généralement monomériques et possèdent au moins un pont disulfure. En effet, l'OBPb ne présente aucun résidu cystéine (Tirindelli *et al.*, 1989) nécessaire à la formation de ponts disulfures et se présente sous la forme d'un homodimère. L'association des deux sous-unités d'OBPb se fait par échange de domaine ou « domain swapping » de leur hélice α C-terminale le long de la sous-unité adjacente (Bianchet *et al.*, 1996, Tegoni *et al.*, 1996 ; Figure B-1). Ce phénomène d'échange de domaine est unique dans le monde des OBP et semble dû à l'absence d'un résidu cystéine conservé en position 121 chez les autres OBP. En effet, l'ajout d'une glycine après le résidu 121 (bOBP-Gly+) abolit la dimérisation de l'OBPb (Ramoni *et al.*, 2008). De plus, la mutation des résidus Trp64 et His155 en cystéines, permet la création d'un pont disulfure, maintenant l'OBPb sous forme de monomère (Ramoni *et al.*, 2008). L'association des deux monomères par « domain swapping » semble créer un troisième site putatif de liaison aux odeurs, à l'interface des deux sous-unités, en plus des deux poches hydrophobes de chaque monomère (Tegoni *et al.*, 1996). L'extrémité N-terminale (1-15) libre n'est pas visible par cristallographie (pas de densité électronique) car probablement flexible (Bianchet *et al.*, 1996). Aucune affinité spécifique pour des molécules chimique de nature particulière n'a pu être observée pour l'OBPb (Pevsner *et al.*, 1990). L'OBPb ne montre pas de spécificité de liaison particulière, toutefois elle est une des rares OBP dont le ligand naturel, l'1-octen-3-ol, a pu être identifié (Ramoni *et al.*, 2001).

Ce chapitre décrira les études biochimiques des protéines extraites des tissus olfactifs des animaux détecteurs (femelles congénères et mâles), le mucus nasal étant la première barrière franchie par les odeurs ou les phéromones avant la détection par les récepteurs olfactifs ou voméronasaux. Ces études se sont naturellement focalisées sur l'OBPb, protéine majoritaire des tissus olfactifs et candidate naturelle pour la mise au point de biosenseurs. Grâce aux outils acquis pour l'étude de ces protéines, des analyses préliminaires de la composition protéique des fluides et tissus émetteurs ont pu être entreprises.

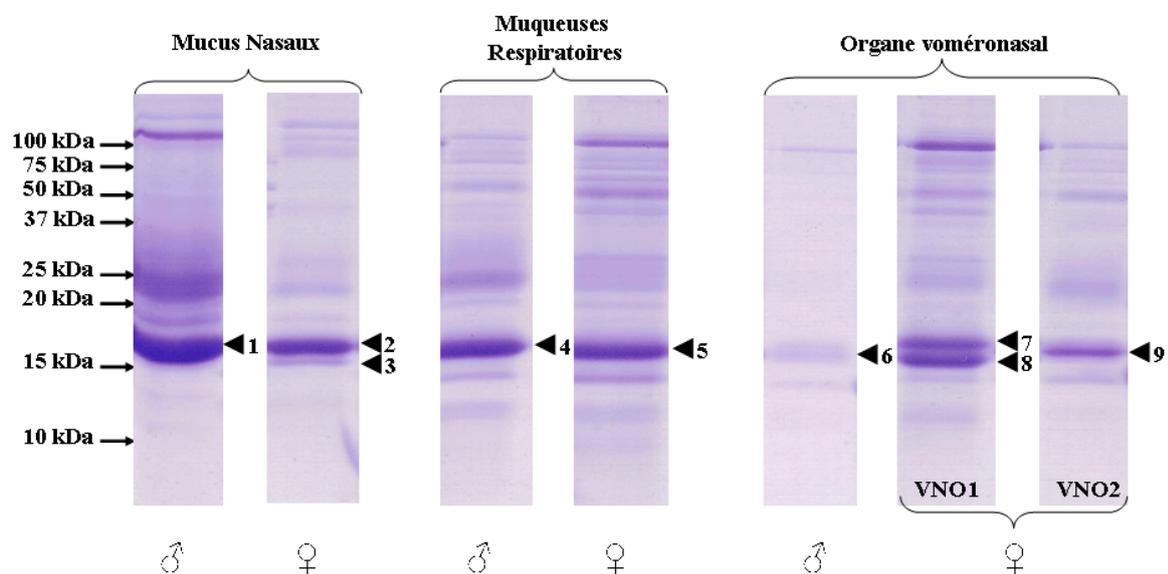


Figure B-2 - Electrophorèse en conditions dénaturantes des échantillons protéiques de mucus nasal (MN), de muqueuse respiratoire (MR) et d'organe voméronasal (VNO) extraits à partir de tissus femelle et mâle. Les flèches indiquent les protéines qui ont été soumises à une digestion trypsique avant analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les masses obtenues sont référencées dans le tableau B-1.

B-I - Caractérisation des protéines contenues dans les tissus olfactifs (MR, VNO et MN)

Les protéines ont été extraites des tissus olfactifs MR, VNO et du mucus nasal par une partition de phase. Cette méthode évite toute précipitation des protéines et permet de les conserver dans leur état natif et notamment de maintenir le ligand naturel, s'il existe, dans la cavité protéique (Guiraudie, 2003 ; Le Danvic *et al.*, 2009). Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et non dénaturantes (PAGE). En conditions dénaturantes, les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire apparente, tandis qu'en conditions non dénaturantes, la séparation s'effectue selon leur charge nette et leur forme. La réticulation du gel choisie (16,8% acrylamide/bisacrylamide) permet une séparation fine des protéines de faible poids moléculaire.

B-I-1 - Séparation des protéines par SDS-PAGE

La comparaison du contenu protéique des différents tissus olfactifs après séparation en conditions dénaturantes montre la présence d'une protéine majoritaire migrant aux environs de 15 kDa (Figure B-2) quelque soit le tissu ou le sexe de l'animal. L'extrait de VNO femelle VNO1 contient deux protéines majoritaires de poids moléculaires voisins de 15 kDa, mais différant de celui de la bande observée dans les autres échantillons. N'ayant pas d'anticorps à notre disposition, nous avons entrepris l'identification de ces protéines majoritaires par cartographie peptidique. Pour cela, les bandes correspondantes (indiquées par des flèches numérotées de 1 à 9 dans la figure B-2) sont excisées du gel et soumises à une digestion par la trypsine. Cette enzyme hydrolyse des liaisons engageant les résidus lysine et arginine de la chaîne polypeptidique. Cette lyse protéique produit des peptides spécifiques de chaque séquence protéique permettant l'obtention d'une carte peptidique théorique propre à chaque protéine (empreinte) fournie par le logiciel PeptideMass sur le site "www.expasy.org". Les peptides obtenus expérimentalement par spectrométrie de masse MALDI-TOF sont alors comparés à cette carte théorique pour reconstituer la séquence de la protéine. Dans une première approche, une recherche dans la banque de données MASCOT est effectuée. La

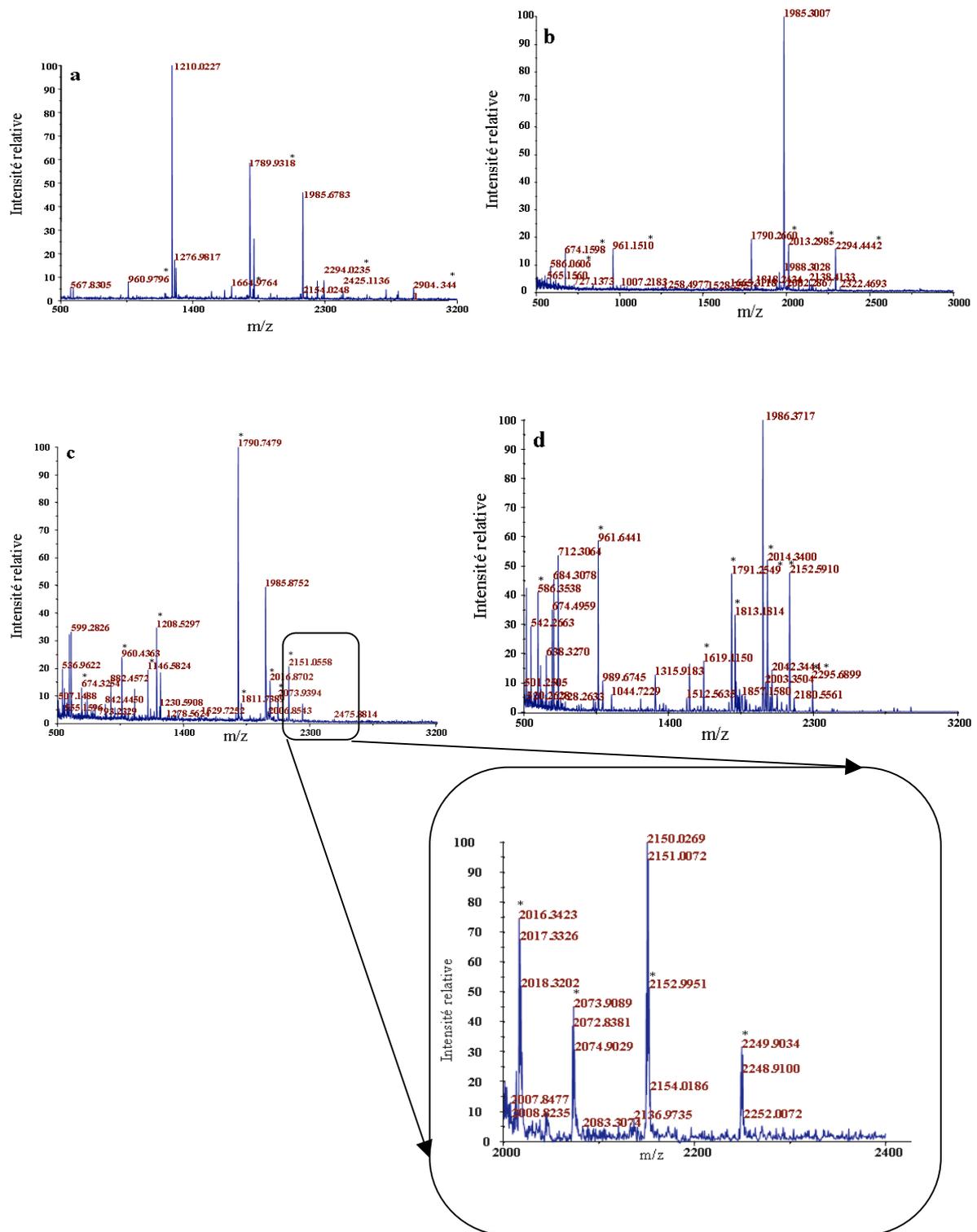


Figure B-3 - Cartographie peptidique de l'OBPb - Exemple de spectres de masse MALDI-TOF des peptides de la bande 2 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides ont été élués avec différents pourcentages d'ACN: 12 % (a), 25 % (b), 50 % (c) et 80 % (d). En encart est figuré un agrandissement de la zone m/z 2000 à 2400 du spectre de masse obtenu après élution des peptides à 50 % d'acétonitrile où l'on peut observer le peptide de masse 2072,8381 Da.

séquence peptidique de l'OBPb est déposée dans GenBank sous le numéro d'accèsion P07435 (séquence 1). Cette séquence correspond à la séquence publiée par Tirindelli *et al.* (1989). Une seconde séquence protéique de l'OBPb est également répertoriée sous le n° d'accèsion XM_001253218 (séquence 2), correspondant à la traduction d'un ARNm prédit pour coder une OBPb avec 3 acides aminés qui diffèrent (Figure B-4) :

- une sérine en position 16 au lieu d'une proline,
- une thréonine en position 112 au lieu d'une lysine
- un acide glutamique en position 117 au lieu d'une glycine

**Séquence 1 : Séquence peptidique de l'OBPb cristallisée avec son ligand
N° d'accèsion P07435.2**

*

AQEEEEAEQNLSELSPWRTVYIGSTNPEKIQENGPFRTYFRELVFDDEKGTVDYFYF
SVKRDGKWKNVHVKATKQDDGTYVADYEGQNVFKIVSLSRTHLVAHNINVDKH
* *
GQTTELTÉLFVKLNVEDEDELEKFWKLTEDKGIDKKNVVNFLENEDHPHPE

Séquence 2 : OBPb prédite à partir du contig génomique NW_001502810.1 [Bos taurus]

*

AQEEEEAEQNLSELSSWRTVYIGSTNPEKIQENGPFRTYFRELVFDDEKGTVDYFYF
SVKRDGKWKNVHVKATKQDDGTYVADYEGQNVFKIVSLSRTHLVAHNINVDKH
* *
GQKTELTGLFVKLNVEDEDELEKFWKLTEDKGIDKKNVVNFLENEDHPHPE

Figure B-4 - Séquences peptidiques de l'OBPb disponibles dans GenBank – Les acides aminés divergeant entre les deux séquences peptidiques sont indiqués par des astérisques.

L'élution des peptides obtenus par digestion trypsique a été effectuée selon un gradient d'ACN (12 %, 25 %, 50 % et 80 % d'ACN). Cette méthode d'élution utilisée au laboratoire a permis d'obtenir des meilleurs recouvrements de carte peptidique pour les OBP et VEG porcines (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b). La figure B-3 présente les spectres MALDI obtenus pour l'OBPb majoritaire des mucus nasaux femelle. Un certain nombre de peptides sont élués quelque soit la concentration d'ACN utilisée : 960,4897 Da, 1789,8140 Da, 2150,087 Da (Tableau B-1). L'élution de peptides surnuméraires (2904,4373 Da, 1618,8233 Da, 1527,7703 Da, Tableau B-1) a permis d'améliorer le recouvrement de la carte peptidique théorique de l'OBPb.

Peptide	Masse théorique	Masse expérimentale						
		Mucus nasaux		Muqueuses respiratoires		Organe voméronasal		
		♂	♀	♀	♂	♀	♂	♀
		1	2	3	4	5	6	9
1-18	2072,9519 ^(c,d)		2072,8197					2072,9007
19-29	1208,6157 ^(c,d)		1208,5297					
19-37	2150,0876 ^(*)		2149,9479	2150,6634	2150,4324	2150,0831	2150,349	
19-41	2717,3681	2717,6994						2717,2948
30-37	960,4897 ^(*)		960,4363					
30-41	1527,7703 ^(d)		1527,6164					
38-41	586,2984			586,3690	586,0636	586,2138	586,2152	
42-59	2138,0328							
42-60	2294,1339 ^(b)	2294,8103	2294,6783	2293,9224	2294,5063	2294,1451		2294,3048
50-63	1618,8223 ^(d)		1618,6434	1618,9122		1618,7730	1618,3519	
60-65	789,4366						789,4157	
61-70	1210,6691							
64-70	910,5257	910,5629						910,4078
64-73	1210,7055							
66-70							596,9655	
71-90	2249,0356				2249,2699	2249,0420		2249,3281
71-96	2904,4373 ^(a)	2904,9776	2904,3083		2904,6505			
91-96	674,4195			674,5140				
91-108	2016,1348			2016,3420	2016,2976		2016,4096	2016,3867
97-112	1810,9670 ^(c)	1810,7014	1810,6269			1810,9264	1810,9167	
113-131	1007,5771					1007,4999		1007,4479
135-144	1146,6364					1146,5706	1146,6107	1146,5825
145-159	1789,8140 ^(*)	1789,8610	1789,7489	1789,9539	1790,2807	1789,7971	1789,9837	1789,7414
Recouvrement de la séquence de l'OBPb		66,66 %	75,47 %	49,05 %	59,74 %	78,62 %	57,23 %	89,31 %

Tableau B-1 - Tableau répertoriant les masses peptidiques obtenues après digestion trypsique et analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des protéines majoritaires des tissus olfactifs bovins après séparation par SDS-PAGE. Les lignes grisées plus foncées correspondent aux peptides contenant les acides aminés variant entre les deux formes de l'OBPb déposées dans GenBank. Les peptides indiqués par un astérisque correspondent aux peptides élués quelque soit le pourcentage d'ACN utilisé tandis que ceux indiqués par les lettres a, b, c et d correspondent aux peptides élués respectivement à 12%, 25%, 50% et 80% d'ACN.

Il est à noter que lors des premiers séquençages de l'OBPb, son peptide N-terminal a été décrit comme bloqué par l'acide iodobenzoïque mais ce blocage avait été attribué aux traitements utilisés pour réaliser le séquençage (Cavagionni *et al.*, 1987 ; Tirindelli *et al.*, 1989). Les cartes peptidiques des protéines majoritaires des tissus migrant entre 15 et 20 kDa ont donc été réalisées après digestion trypsique par analyse des peptides obtenus par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La protéine majoritaire des tissus est l'OBPb, et c'est la première fois que cette protéine est décrite dans l'organe voméronasal chez le mâle et la femelle. Le peptide N-terminal 1-18, permettant la discrimination entre les deux séquences d'OBPb a pu être identifié lors de l'analyse (Tableau B-1 et Figure B-3), uniquement pour l'OBPb majoritaire de tissus femelles. Ce peptide n'est jamais retrouvé lors de l'analyse des OBPb des tissus mâles. La présence d'une bande migrant juste sous l'OBPb majoritaire est observée dans le mucus nasal femelle : sa cartographie peptidique révèle un recouvrement de 51,57 % de la séquence théorique de l'OBPb. Le peptide N-terminal n'a pas été retrouvé, en revanche l'acide aminé en position 112 est une lysine (K), et correspond à la séquence 2 (figure B-4).

Chez la femelle deux échantillons de VNO ont été analysés. Ils correspondent à l'extraction de deux échantillons différents de VNO reçus, VNO1 et VNO2. Comme le montre la figure B-2, les profils protéiques des deux tissus se différencient par la présence de deux protéines entre 15 et 20 kDa pour le VNO1 alors que le VNO2 ne présente qu'une seule protéine pour cette gamme de masse. Après analyse par cartographie peptidique, seule la bande majoritaire du VNO2 (bande 9) s'avère être de l'OBPb. Les deux autres protéines n'ont pas pu être identifiées dans MASCOT, mais leurs spectres ne présentent aucune masse correspondant à un peptide appartenant à l'OBPb. Le VNO se présente sous la forme d'un cylindre dont les deux faces sont différentes, l'une comporte une muqueuse à activité sécrétoire et l'autre, une muqueuse « détectrice » contenant les neurones olfactifs. L'absence d'OBPb, sécrétée par les glandes de Bowman, dans le VNO1 indiquerait que celui-ci correspond à la face « détectrice » contenant les neurones olfactifs.

Peptide	Masse théorique	Masse Expérimentale				
		OBPb majoritaire du MN femelle	1	2	3	4
1-18	2072,9519	2072,9875			2072,6603	
19-37	2150,9876	2150,6331			2150,4295	2150,6784
38-41	586,2984	586,8191			586,4003	
42-59	2138,0328		2138,3782	2138,2311		
42-60	2294,1339	2294,0792			2294,2340	
66-70	596,3514	596,0162				
71-90	2249,0356		2249,5205		2249,4451	
74-90	1948,8559	1948,7984				
91-108	2016,1348	2016,4371		2016,0302	2016,1150	2016,2456
97-112	1810,9670	1810,91124				1810,7894
113-121	1007,5771	1007,8231				
122-134	1664,8166	1664,7459				
132-139	1066,5567	1066,3116				
145-159	1789,8140	1789,75288	1789,8640	1789,9408	1789,7161	1789,9851
Recouvrement de la séquence de l'OBPB		91,8 %	33,96 %	30,44 %	71,06 %	35,22 %

Tableau B-2 - Tableau répertoriant les masses peptidiques obtenues après digestion trypsique et analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des protéines majoritaires des tissus olfactifs bovins séparés par électrophorèse en conditions non dénaturantes. Les lignes grisées plus foncées correspondent aux peptides contenant les acides aminés variant entre les deux formes de l'OBPB déposées dans GenBank.

B-I-2 - Séparation des protéines par PAGE

Les mêmes échantillons ont été séparés en conditions non dénaturantes afin de conserver sa conformation à la protéine. La présence d'une protéine majoritaire est toujours observée dans chaque tissu (Figure B-5, bande indiquée par une flèche). L'analyse des peptides par spectrométrie de masse MALDI-TOF après digestion avec la trypsine indique qu'il s'agit de l'OBPb, avec un recouvrement de 91,8 % pour l'OBPb des mucus nasaux femelle où le peptide de masse 2072.9312 Da, caractéristique du peptide N-terminal non bloqué appartenant à la séquence 1 de l'OBPb a été encore une fois retrouvé (Tableau B-2).

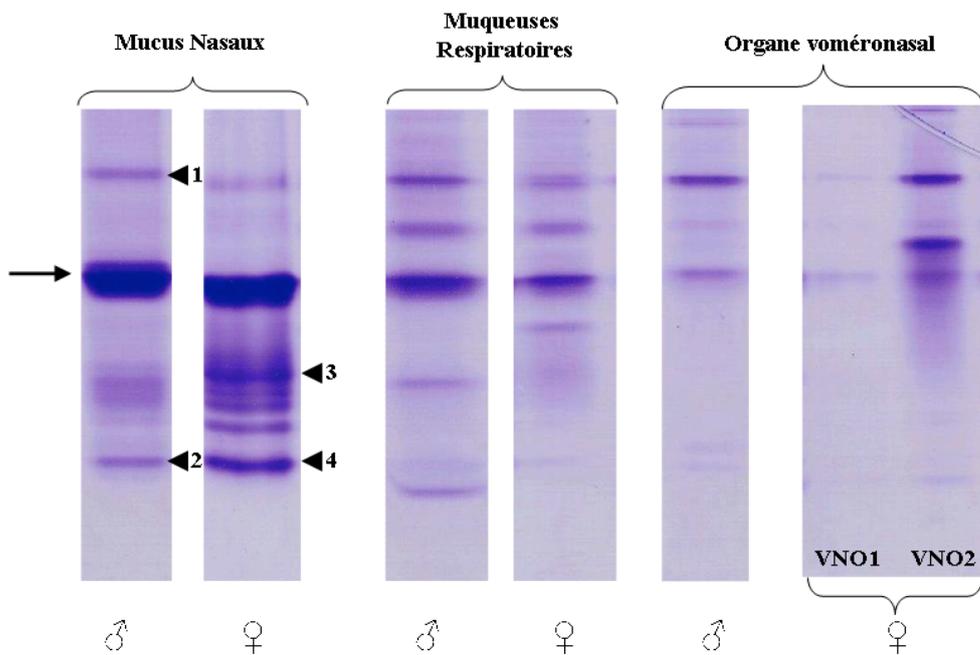


Figure B-5 - Electrophorèse en conditions natives (PAGE) des échantillons protéiques de mucus nasal (MN), de muqueuse respiratoire (MR) et d'organe voméronasal (VNO) extraits à partir de tissus femelle et mâle. Les flèches indiquent les protéines qui ont été soumises à digestion trypsique avant analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les masses obtenues sont référencées dans le tableau B-2.

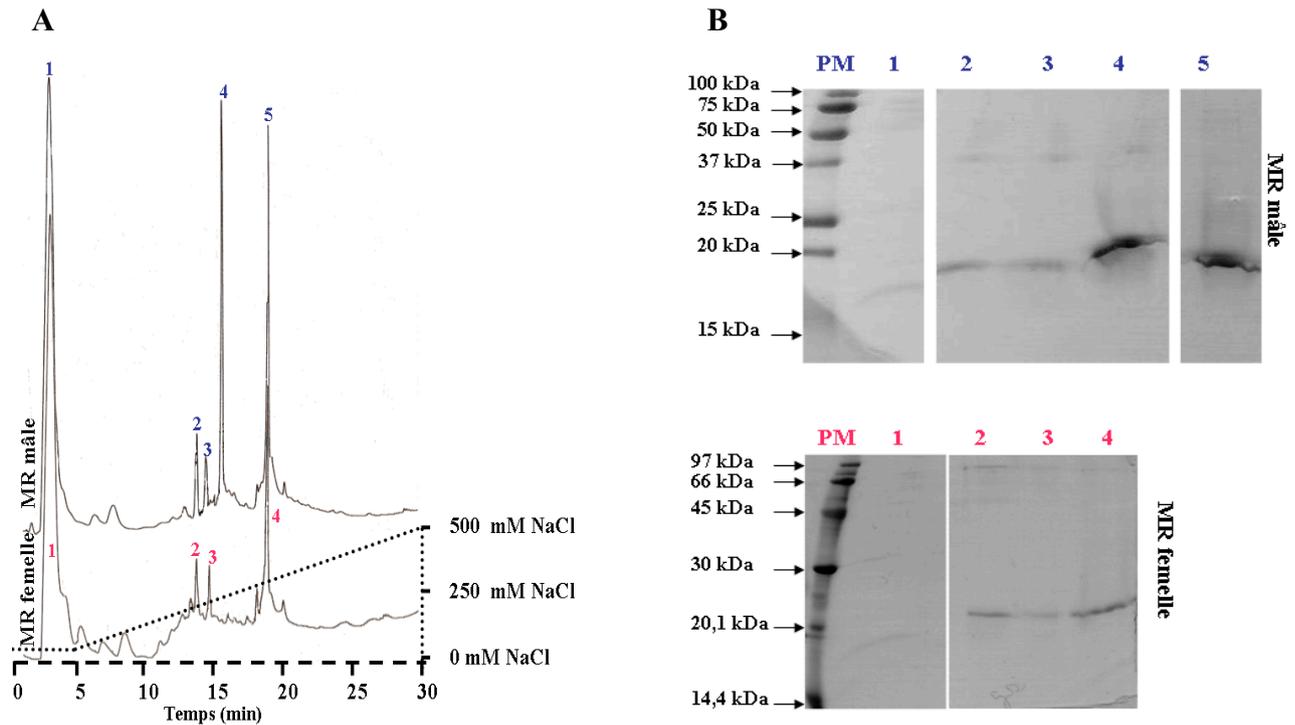


Figure B-6 - Purification des protéines extraites des MR mâles et femelles par HPLC échangeuse d'anions (colonne ProPac PA1) – (A) Chromatogrammes comparés (B) Electrophorèse SDS-PAGE des fractions purifiées (coloration au bleu de Coomassie colloïdal). PM = marqueurs de poids moléculaire.

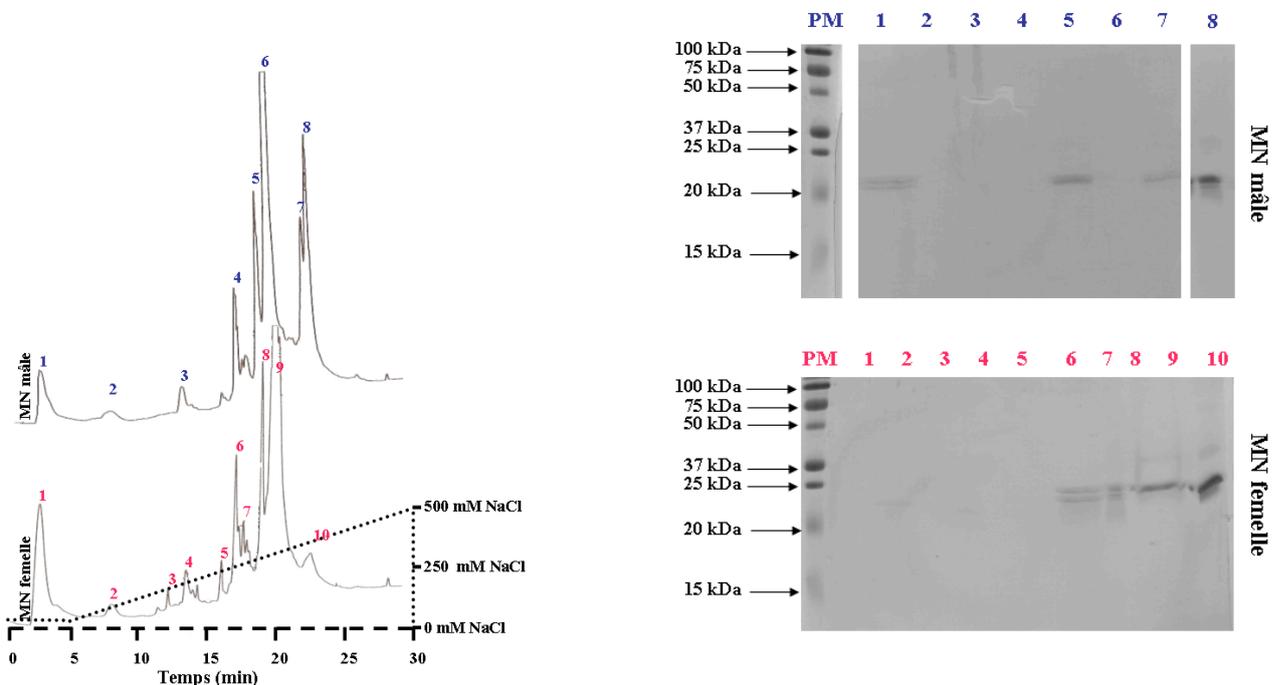


Figure B-7 - Purification des protéines extraites des MN mâles et femelles par HPLC échangeuse d'anions (colonne ProPac PA1) – (A) Chromatogrammes comparés (B) Electrophorèse SDS-PAGE des fractions purifiées (coloration au bleu de Coomassie colloïdal). PM = marqueurs de poids moléculaire. Le gradient de NaCl utilisé pour la séparation est indiqué par des lignes pointillées.

B-I-3 - Purification des protéines des tissus olfactifs par chromatographie échangeuse d'anions

L'équivalent de 50 µg d'extraits de MR et de MN mâle et femelle ont été purifiés par HPLC avec une colonne échangeuse d'anions en utilisant un gradient linéaire de NaCl.

Le chromatogramme issu de la purification de l'extrait de MR mâle présente cinq pics (Figure B-6A). Les fractions éluées ont été collectées, puis analysées par électrophorèse SDS-PAGE (Figure B-6B). La purification des protéines extraites de la MR femelle présente le même type de profil, hormis l'absence du pic élué à 206 mM (Figure B-6A). L'analyse par électrophorèse SDS-PAGE des fractions collectées montre la présence d'une protéine migrant à environ 20 kDa pour chaque pic. Une cartographie peptidique de la protéine contenue dans les fractions collectées a été réalisée et confirme la présence d'OBPb dans les fractions 3, 4 et 5 (éluées respectivement à 170, 206 et 290 mM de NaCl) de la MR mâle et dans les fractions 3 et 4 (éluées respectivement à 170 et 290 mM de NaCl) de la MR femelle (Annexe 4). Les protéines obtenues dans les fractions 1 et 2 n'ont pu être identifiées.

Les chromatogrammes issus de la purification des protéines extraites des MN mâle et femelle sont plus complexes et contiennent de 8 à 10 pics (Figure B-7A). L'analyse par SDS-PAGE des fractions collectées montre la présence de deux bandes protéiques migrant autour de 20 kDa en faible quantité dans la fraction 1 (non retenue) mâle (Figure B-7B). Une seule bande avait été observée dans les MR mâle et femelle pour cette fraction non retenue (Figure B-6B). Les fractions 5, 7 et 8, éluées respectivement à 150, 310 et 325 mM de NaCl, contiennent des protéines de masse d'environ 20 kDa (MN mâle). Le profil d'élution des protéines extraites à partir de la MN femelle est un peu plus complexe. L'analyse par SDS-PAGE montre la présence de protéines migrant aux environs de 20 kDa pour les fractions 7, 8, 9 et 10, éluées respectivement à 200, 255, 270 et 325 mM de NaCl (Figure B-7B). Les fractions 7 et 8 semblent contenir deux protéines. Les protéines éluées à partir de MN femelle présentent des propriétés physico-chimiques différentes de celles des MN mâles. La cartographie peptidique de ces isoformes d'OBPb n'a pourtant pas permis de les distinguer les unes des autres (Annexe 5).

Cette purification a permis de confirmer l'existence de variants de l'OBPb dans le mucus nasal (que nous avons pu observer par cartographie peptidique chez la femelle) et montrer que cette diversité était également présente dans la MR. Il existe donc une variété d'isoformes d'OBPb dans les tissus mâles et femelles.

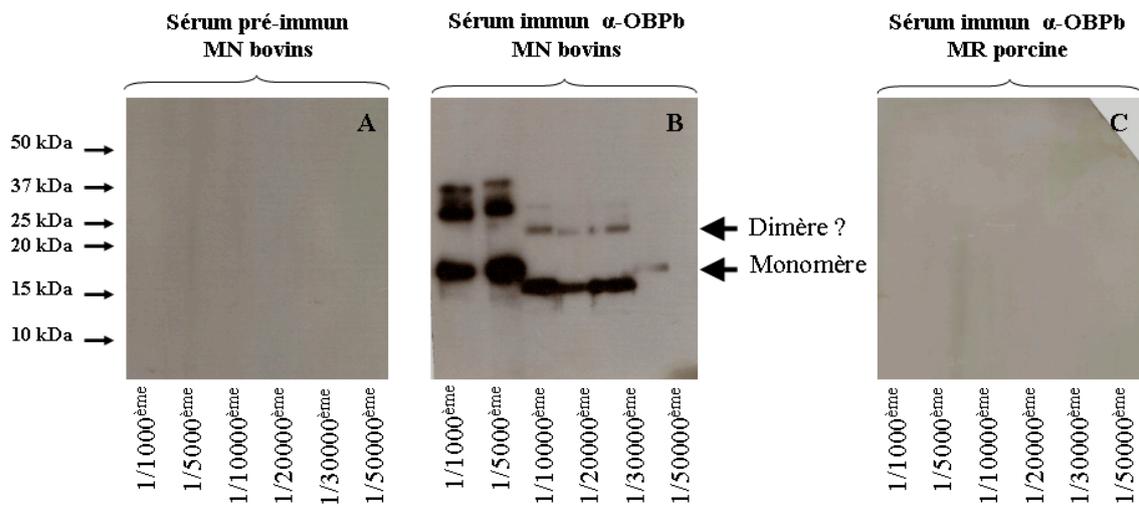


Figure B-8 - Test du sérum anti-OBPb produit chez le lapin à partir de l'OBPb majoritaire purifiée à partir de la muqueuse respiratoire mâle - (A) Test du sérum pré-immun, (B) Test du sérum immun sur le mucus nasal de taureau, (C) Test du sérum immun anti-OBPb sur des extraits protéiques de MR porcine. Les sérums pré-immun et immun ont été testés pour les mêmes dilutions de 1/1000^{ème} à 1/50000^{ème}. La détection s'est effectuée après 30 secondes d'exposition au révélateur ECL⁺ (Amersham).

B-I-4 - Localisation de l'OBPb par détection immunologique

B-I-4-1 - Production d'anticorps polyclonaux anti-OBPb

Pour contrôler et faciliter la détection des différentes isoformes de l'OBPb dans les deux muqueuses olfactives (MR et VNO) ainsi que dans le mucus nasal, un sérum de lapin immun anti-OBPb a été produit au laboratoire (J.P. Decottignies, UGSF UMR 8576 CNRS/USTL). Un lapin de race Néozélandaise a été immunisé trois fois avec 500 µg de l'OBPb majoritaire (Fraction 4 éluée à 206 mM NaCl) purifiée à partir de la MR mâle (Figure B-6). Il est à noter que cette fraction 4 correspond à la fraction non présente dans la MR femelle (Figure B-6). Au moment des immunisations, nous n'avions pas encore les échantillons de tissus femelles. Si cela avait été le cas nous aurions utilisé la fraction d'OBPb éluée à 290 mM NaCl commune aux MR mâle et femelle. Dix jours après la troisième immunisation, le sérum immun a été collecté et testé en parallèle du sérum pré-immun, pour sa spécificité de détection des protéines extraites à partir de MN bovin mâle (Figure B-8) pour des dilutions allant de 1/1000^{ème} à 1/50 000^{ème}. Aucun signal ne peut être observé après Western-blot réalisé avec le sérum pré-immun (Figure B-8A). Aucun croisement avec les anticorps secondaires anti-Ig de lapin, utilisés pour marquer les anticorps anti-OBPb ne peut donc se produire. Les signaux obtenus avec le sérum immun s'avèrent très intenses, des signaux nets pouvant être observés jusqu'à une dilution au 1/ 30000^{ème} (Figure B-8B) ce qui n'est pas étonnant, les lipocalines ayant un fort pouvoir immunogène (Flower, 1996). Deux signaux sont observés entre 15 et 20 kDa, et un autre à 37 kDa pour l'ensemble des dilutions. Ce marquage peut correspondre au dimère de l'OBPb ($2 \times 18,8 \text{ kDa} = 37,6 \text{ kDa}$) qui n'aurait pas été totalement dissocié et donc monomérisé après les étapes de dénaturations préalables au SDS-PAGE. En effet, avant dépôt sur gel dans des conditions dénaturantes, les échantillons sont repris dans un tampon de charge contenant du SDS et du β -mercaptoéthanol (agents dénaturants) et bouillis pendant 5 minutes. Il semblerait qu'une trace d'OBPb dimérisée subsiste malgré cette étape de dénaturation. Un troisième signal est observé pour les dilutions plus faibles du sérum immun au-dessus de 37 kDa. Ce signal pourrait également correspondre au dimère de l'OBPb. La différence de migration entre les deux pouvant s'expliquer par la composition du dimère avec différentes isoformes de l'OBPb.

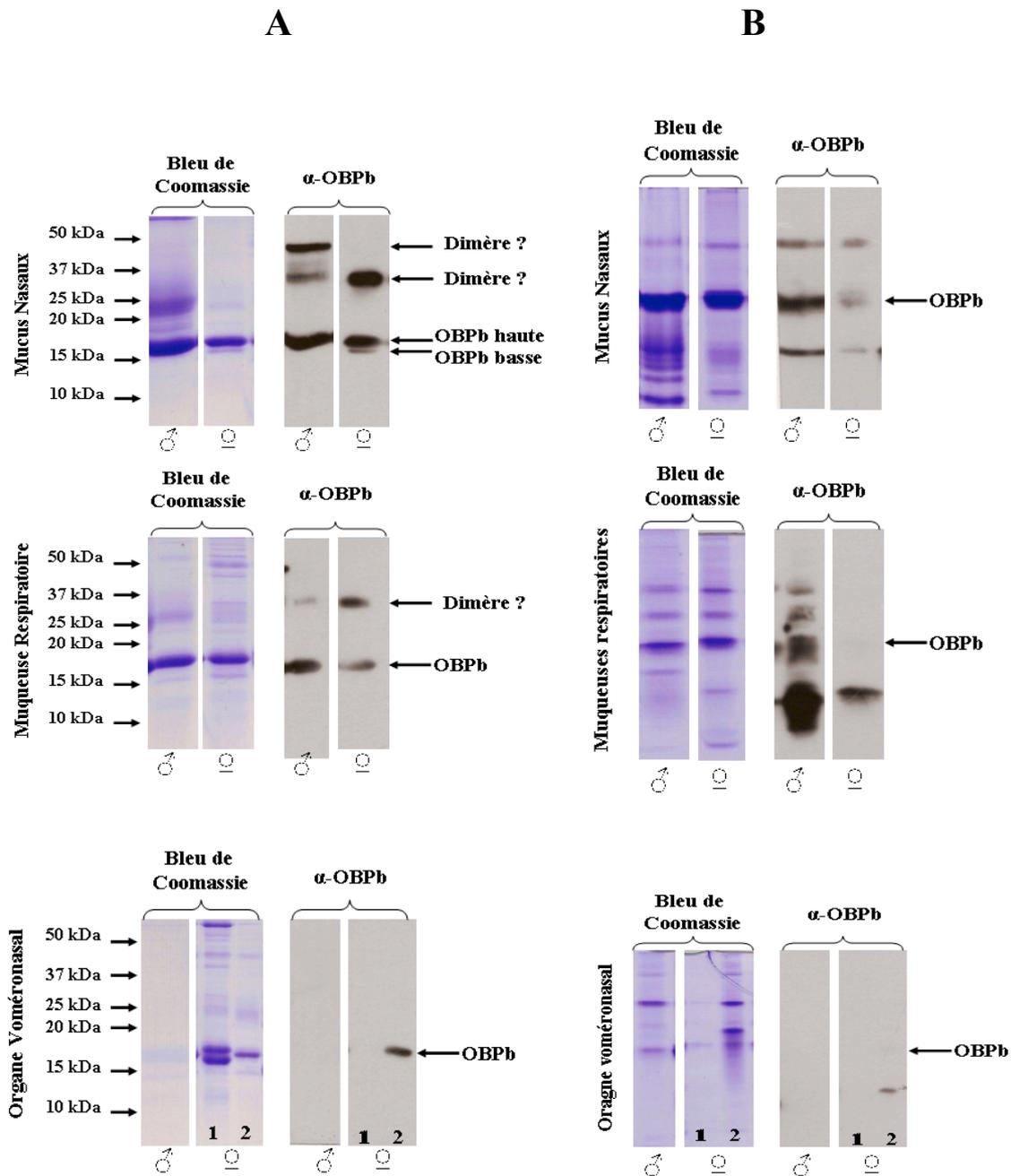


Figure B-9 - Immunodétection de l'OBPb dans les tissus olfactifs (MR et VNO) et dans les mucus nasaux mâle et femelle - La séparation des protéines a été effectuée en conditions dénaturantes (A) et en conditions non dénaturantes (B). Pour chaque tissu analysé, sont présentés à gauche les gels d'électrophorèse colorés au bleu de Coomassie colloïdal et à droite leur équivalent sur film après révélation photographique. Le tissu analysé est indiqué sur le côté gauche des gels. Le temps d'exposition de la membrane au révélateur ECL⁺ (Amersham) est de 30 secondes pour un anticorps anti-OBPb diluée au 30000^{ème}. L'OBP majoritaire identifiée par cartographie peptidique est indiquée sur le côté droit par une flèche.

Le sérum immun a également été testé, avec les mêmes dilutions, sur des protéines extraites de MR porcine contenant de l'OBPp partageant 43,7 % d'homologie avec l'OBPb (Spinelli *et al.*, 2002), afin de confirmer sa spécificité. Pour une même quantité d'échantillon protéique déposée, aucun signal n'est observé chez les porcins, et ceci même pour la dilution la plus faible de l'anticorps α -OBPb produit (Figure B-8C).

B-I-4-2 - Analyse des tissus et fluides du système olfactif

B-I-4-2-1 - Western-blot après SDS-PAGE

Après séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes, plusieurs signaux sont observés dans les MN et MR mâle et femelle. Cette forme dimérisée de l'OBPb est beaucoup plus immunoréactive que son monomère. En effet, sa présence sur le gel coloré au bleu de Coomassie colloïdal est à peine détectable et pourtant le signal émis est aussi intense, voire plus intense que celui du dimère. Ceci peut s'expliquer par le fait que la fraction injectée au lapin contient une protéine purifiée non dénaturée et donc probablement sous forme dimérique. Une majorité des épitopes correspondrait à des domaines du dimère, et les autres au monomère. Un troisième signal différent pour les deux sexes est observé dans les MN. Chez la femelle, ce signal correspond à une bande protéique se situant juste sous l'OBPb majoritaire indiquant la présence de l'OBPb minoritaire ou OBPb basse (Figure B-9A) identifiée précédemment par cartographie peptidique. En revanche, chez le mâle, ce troisième signal est observé pour une bande protéique de taille estimée (par rapport aux poids moléculaires) entre 37 et 50 kDa. La nature de cette protéine n'a pu être déterminée. En effet, sa présence étant à peine visible (donc ne pouvant être excisée) une cartographie peptidique ne peut pas être envisagée. Un trimère de l'OBPb semble peu probable car celui-ci devrait vraisemblablement migrer plus haut sur le gel. Toutefois, des phénomènes d'agrégation des OBP ont pu être observés au laboratoire pour les OBPp lorsque celles-ci sont en concentration trop importante. Ces protéines pourraient donc à forte concentration former des polymères ou des agrégats. Des signaux de tailles identiques correspondant au monomère et au dimère de l'OBPb sont observés dans les MR mâle et femelle. On remarquera tout de même un marquage moins fort pour le dimère de la MR mâle que pour la MR femelle au profit du monomère. Ceci peut s'expliquer par une meilleure dénaturation du dimère.

Aucun signal n'est observé dans le VNO1 de femelle qui ne contient donc pas d'OBPb, et un seul signal correspondant au monomère est observé dans le VNO2, ce qui est cohérent avec ce qui avait été trouvé dans les cartes peptidiques des VNO femelles (Tableau B-1). En

revanche, l'OBPb identifiée dans le VNO mâle, avec un faible pourcentage de recouvrement, ne montre qu'un faible signal après une exposition plus longue au révélateur. Il est à noter qu'une plus faible quantité d'échantillon protéique avait été déposé (faute d'échantillons disponibles) ce qui pourrait expliquer ce signal amoindri. Une forme différente de l'OBPb dans le VNO mâle n'est toutefois pas à exclure.

Ces premiers résultats de Western-Blot après SDS-PAGE confirment ceux obtenus lors de l'établissement des cartes peptidiques et donc l'existence dans le MN femelle d'une OBPb minoritaire migrant légèrement plus bas que la majoritaire. De plus, il semblerait que les dimères (voire polymères de la protéine) subsistent après les traitements dénaturants. Toutefois, l'hétérogénéité observée suite à la purification des protéines par HPLC n'est pas retrouvée. Il semblerait que les isoformes d'OBPb se différencient principalement par la charge et non par le poids moléculaire.

B-I-4-2-2 - Western-blot après PAGE

Le Western-Blot des échantillons protéiques séparés **en conditions non dénaturantes**, préservant la conformation des protéines, révèle une plus grande hétérogénéité des signaux révélés (Figure B-9B). Trois signaux sont observés dans le MN mâle (tout comme lors de la séparation par SDS-PAGE). L'OBPb majoritaire observée sur le gel coloré au bleu n'est pas celle qui répond le plus aux anticorps. La protéine réagissant le plus correspond à la bande 1, analysée dans le paragraphe 1, mais qui n'avait pas pu être identifiée. Un pI supérieur à celui de l'OBPb et/ou un encombrement stérique plus important de cette protéine expliquerait sa migration plus lente. Ce signal pourrait alors correspondre au trimère évoqué plus haut. Le signal en dessous correspondrait au dimère (migration classique), et le signal inférieur au monomère de l'OBPb. Chez la femelle, les signaux observés dans le MN sont similaires à ceux observés pour le mâle avec trois marquages principaux. La présence d'un léger marquage supplémentaire est observée juste entre les deux marquages supérieurs. Seul signal surnuméraire, il pourrait correspondre à l'OBPb minoritaire décrite lors des analyses par SDS-PAGE. A peine visible sur le gel coloré au bleu, cette bande n'a pas pu être identifiée par cartographie peptidique.

Les signaux observés dans la MR mâle présentent des intensités proportionnellement inversées par rapport à l'estimation de la quantité de protéines observée sur le gel coloré au bleu de Coomassie colloïdal (Figure B-9B). La MR femelle montre un profil d'immunodétection totalement différent de celui observé chez le mâle. Un seul marquage net

au niveau de l'OBPb migrant le plus bas peut être observé. Une exposition plus longue laisse apparaître un signal au niveau de l'OBPb majoritaire sous sa forme dimérisée. Cette absence de signal est curieuse car la protéine est présente en quantité importante dans l'extrait analysé. De plus, en conditions dénaturantes, les mêmes profils d'immunodétection étaient observés chez le mâle et la femelle. En conditions de séparation non dénaturantes, le dimère de l'OBPb n'est pas détecté dans la MR femelle. Ces observations sont concordantes avec les profils d'élution en HPLC et laissent supposer l'existence de variants de l'OBPb présentant des charges nettes différentes.

Le marquage observé dans le **VNO2** femelle de l'OBPb est similaire à celui observé pour la MR femelle, bien que les profils de migration soient différents. Ce marquage correspond au monomère de l'OBPb (migrant le plus bas) bien que cette forme soit minoritaire sur le gel coloré en bleu. La forme dimérique est à peine marquée. Curieusement, deux bandes protéiques migrant au-dessus du dimère de l'OBPb sont plus intenses et ne sont pas marquées par les anticorps.

Les Western-blot réalisés sur des extraits protéiques séparés **en conditions non dénaturantes** montrent des différences quant à la capacité de détection des OBPb par le sérum α -OBPb. En effet, des protéines identifiées comme de l'OBPb ou montrant un nombre important de peptides en commun avec l'OBPb ne sont pas détectées. Ceci implique une non accessibilité de l' α -OBPb pour ces épitopes ou l'existence d'épitopes différents.

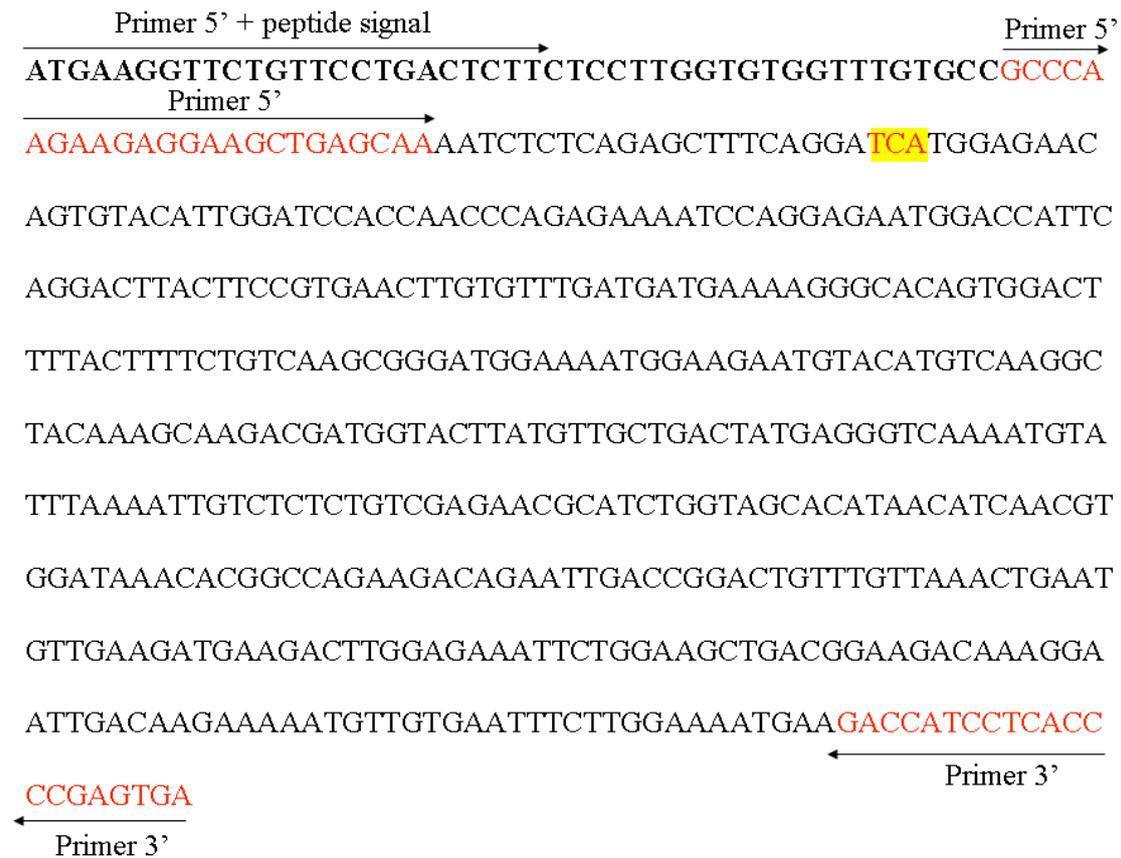


Figure B-10 - Séquence nucléotidique de l'OBPb avec une localisation des amorces utilisées pour l'amplification des transcrits de l'OBPb dans les tissus. Le codon TCA surligné en jaune correspond au codon codant l'acide aminé en position 16, codant soit pour une proline (séquence 1) soit pour une sérine (séquence 2).

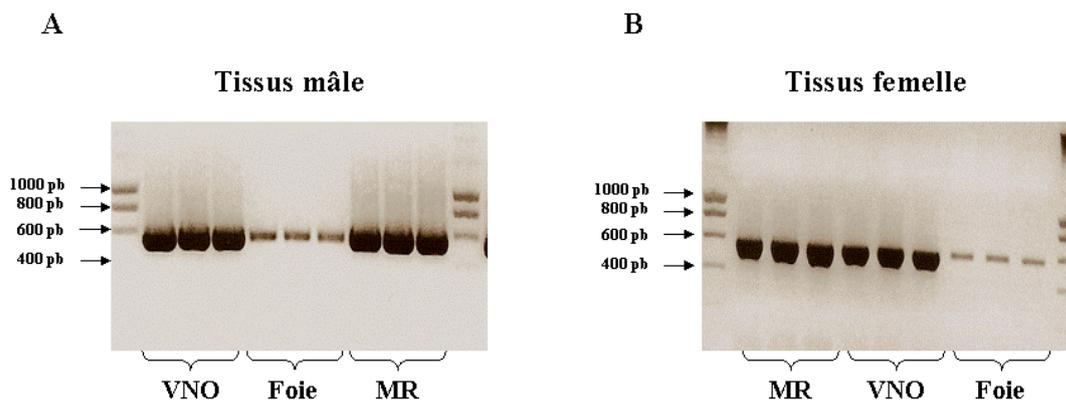


Figure B-11 - Fragments d'ADNc amplifiés par RT-PCR avec les oligonucléotides spécifiques de l'OBPb. Les RT-PCR ont été effectuées à partir d'ARN totaux extraits de VNO, de MR et de foie mâle et femelle avec des amorces spécifiques de l'OBPb dessinées à partir de la séquence nucléotidique prédite, séquence 2 (n° d'accèsion NW_001502810.1).

B-I-5 - Caractérisation des différentes isoformes de l'OBPb

B-I-5-1 - Recherche de variants nucléotidiques

La recherche des ADNc codant l'OBPb dans les MR, VNO et foie, mâle et femelle, a été entreprise par RT-PCR en utilisant des amorces dessinées à partir de la séquence 1 de l'OBPb prédite (n° d'accèsion NW_001502810.1). L'amorce 5' couvre la séquence nucléotidique codant le peptide signal, et l'amorce 3', la séquence codant l'extrémité C-terminale de la protéine (Figure B-10). Ainsi un ADNc de 574 pb a pu être amplifié dans l'ensemble des trois tissus chez le mâle ou la femelle (Figure B-11). Nous n'avons pu obtenir le résultat de séquençage que pour les tissus mâles. Que ce soit dans le VNO, la MR ou le foie, les séquences obtenues sont identiques à la séquence nucléotidique prédite de l'OBPb (n° d'accèsion NW_001502810.1), soit la séquence 2 codant l'OBPb présentant une sérine en position 16 (« GSW »). Lors des cartographies peptidiques, chez le mâle, aucun peptide N-terminal n'a été retrouvé. Mais un peptide N-terminal de masse 2072.8197 Da, indiquant un résidu proline en position 16 (« GPW ») a été retrouvé dans l'OBPb majoritaire des MN femelle. Ceci suggère qu'il existe un variant mâle et un variant femelle. L'obtention des résultats du séquençage pour les tissus femelles permettra de le confirmer.

Récemment une 5'RACE-PCR a été entreprise de façon à confirmer la séquence de l'extrémité 5' de la séquence nucléotidique. Comme nous avons trouvé de façon quasi systématique le peptide C-terminal de l'OBPb, nous avons entrepris la recherche d'une séquence N-terminale variable potentielle. Les résultats obtenus pour l'instant n'ont pas permis de mettre en évidence d'ADNc de taille correspondant à la taille souhaitée. Donc aucune confirmation de l'existence d'une variabilité de séquence nucléotidique en 5' n'a pu être apportée.

Modification post-traductionnelle prédite	Résidu concerné	Contexte peptidique	Score
N-glycosylation	Asn 9	EAEQ N LSEL ▲	0,6352
Phosphorylation	Ser 16	ELSG S WRTV ▲	0,576
Phosphorylation	Ser 57	DFYF S VKRD ▲	0,965
Phosphorylation	Tyr 79	DDGT Y VADY ▲	0,921
Phosphorylation	Ser 95	IVSL S RTHL ▲	0,682

Tableau B-3 - Récapitulatif des modifications post-traductionnelles prédites après les analyses par bioinformatique. Les acides aminés potentiellement modifiés sont indiqués par une flèche.

AQEEEEAEQ**N**LSEL**S**SG**S**WRTVYIGSTNPEKIQENGPFRTYFRELVFDDEKGT
 VDFYF**S**VKRDGKWKNVHVKATKQDDGT**Y**VADYEGQNVFKIV**S**LSRTHL
 VAHNINVDKHGQ**K**TELT**G**LFVKLNVEDEDLEKFWKLTEDKGIDKKNVV
 NFMENEDHPHPE

Figure B-12 - Séquence peptidique de l'OBPb figurant les modifications post-traductionnelles prédites. Les acides aminés indiqués par un astérisque correspondent aux acides aminés potentiellement modifiés, ceux surlignés en jaune correspondent aux acides aminés différant entre les séquences 1 et 2.

B-I-5-2 - Recherche de modifications post-traductionnelles pour l'OBPb

La position des variants de l'OBPb sur les gels d'électrophorèse, la purification par HPLC et les Western-blot suggèrent que les isoformes d'OBPb diffèrent par leur charge nette plutôt que par leur taille. Ceci évoque la possibilité de modifications post-traductionnelles. L'existence de telles modifications a été décrite pour des lipocalines impliquées dans la détection de phéromones chez les mammifères. Ainsi l'aphrodisine de Hamster, ou la SAL porcine portent plusieurs chaînes N-glycanniques (Briand *et al.*, 2000 ; Loëbel *et al.*, 2000). De façon plus surprenante, la présence d'un résidu *O*-GlcNac et de phosphorylations, modifications post-traductionnelles effectuées par les voies métaboliques intracellulaires, ont pu être mises en évidence sur des OBPs porcines, protéines sécrétées (Le Danvic *et al.*, 2009, Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b). Des travaux récents réalisés au laboratoire ont permis non seulement de mettre en évidence par des techniques d'immunochimie la présence de phosphorylations sur l'OBP et la VEG porcines, mais aussi de les localiser (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b). Jusqu'à présent, aucune modification post-traductionnelle n'a été mise en évidence pour l'OBPb.

B-I-5-2-1 - Analyse *in silico*

Les analyses *in silico* des modifications post-traductionnelles potentielles (MPT) de l'OBPb ont été réalisées à l'aide du site « www.expasy.org » en utilisant les deux séquences protéiques référencées dans GenBank de l'OBPb. Grâce aux différents algorithmes disponibles, deux types de MPT sont prédites pour l'OBPb : un site de N-glycosylation sur l'asparagine 9 (N9) et 3 sites de phosphorylations potentiels (S57, S95 et Y79) pour la séquence protéique 1 de l'OBPb P0735 (Tableau B-3, Figure B-12). Un quatrième site de phosphorylation est prédit pour la séquence 2 déduite de l'ARNm XP_001253219.1 au niveau de la S16. Le site de N-glycosylation est défini par le motif consensus Asn-X-Ser/Thr. Aucune *O*-glycosylation, ni *O*-N-acétyl-glucosaminylation ne sont prédites.

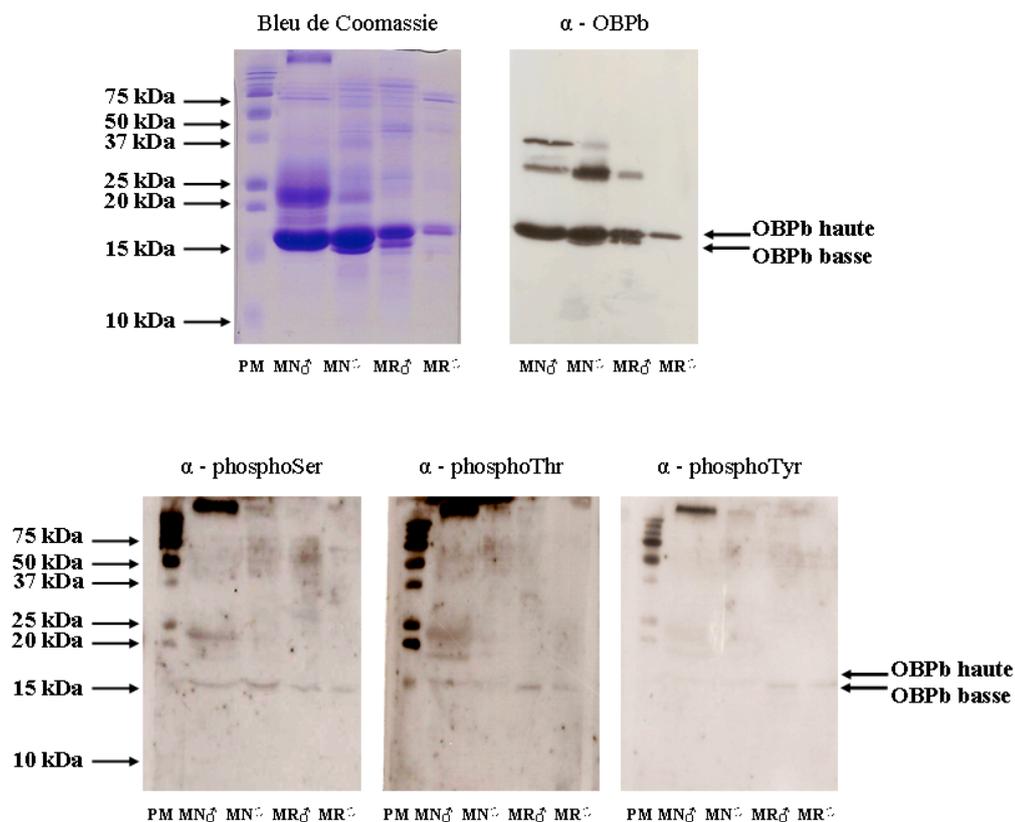


Figure B-13 - Immunodétection des phosphorylations de l'OBPb par Western-Blot réalisé avec les trois anticorps, anti-phosphosérine, anti-phosphothréonine et anti-phosphotyrosine.

Peptide	Masse théorique				Masse mesurée	Séquence
	Sans DTT	+ 1 DTT (+136,2 Da)	+ 2 DTT (+272,4 Da)	+ 3 DTT (+408,6 Da)		
38-41	586,2984	722,4984			722,1159	TYFR
38-49	1561,7533	1697,9533			1697,9111	TYFRELVFDDEK
50-59	1162,5779			1571,1779	1571,3749	GTVDYFYSVK
50-60	1318,6790		1591,0079		1590,8725	GTVDYFYSVKR
50-63	1618,8223			2027,4223	2027,7508	GTVDYFYSVKRDGK
91-96	674,4195	810,6195			810,7580	IVLSLR
109-121	1502,7849			1911,3849	1911,5617	HGQTTELTELTVK

Tableau B-4 - Localisation des sites de phosphorylation de l'OBPb par la technique du BEMAD.

V-2-2 - Etude de la phosphorylation de l'OBPb

La présence de phosphorylations sur l'OBP bovine des muqueuses respiratoires et des mucus nasaux mâle et femelle a été recherchée par Western-blot. Les anticorps utilisés sont spécifiques de chaque acide aminé pouvant porter une phosphorylation soit des anticorps dirigés contre les résidus sérine, thréonine et tyrosine phosphorylés.

Un marquage est observé à la position de l'OBPb avec chacun des anticorps. L'intensité du signal est variable en fonction du tissu. De plus, un marquage est observé au niveau de l'OBPb des MN mâle et des MR mâle et femelle avec l'anticorps anti-phosphothréonine, alors qu'aucune phosphorylation n'est prédite pour les résidus Thr. Un faible signal est observé avec les anticorps anti-phosphotyrosine sur les MR mâle et femelle. Ces expériences d'immunodétection indiquent la présence possible de phosphorylations sur l'OBPb.

Des expériences de **BEMAD** ont été entreprises pour localiser les phosphorylations sur les OBPb du **MN femelle**. Cette technique a été utilisée avec succès au laboratoire pour localiser les phosphorylations sur les OBP porcines (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b). A partir d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, les deux bandes d'OBPb, OBPb haute et basse, ont été découpées (un pool de l'équivalent de cinq bandes basses a été utilisé de façon à avoir suffisamment de matériel protéique). Après digestion trypsique, les peptides sont soumis à un traitement à la phosphatase alcaline de façon à éliminer les groupements phosphates, avant ajout d'un groupement de DTT par une réaction de Michaël. L'ajout d'un groupement DTT sur un peptide augmente sa masse de 136,2 kDa qui peut être détectée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les peptides présents dans la bande haute correspondent à des peptides de masse non modifiée donc non phosphorylés (560,2548 Da, 605,1321 Da, 994,0905 Da, 1007,5482 Da, 1618,0132 Da). En revanche, cinq peptides modifiés sont observés sur les spectres de masse de l'OBPb basse (Tableau B-4). Deux peptides de masse modifiée par l'ajout d'un DTT, les peptides [38-41] et [38-49], indiquent la phosphorylation du résidu T38 ou Y39. De la même façon, trois peptides modifiés par l'ajout de deux ou trois DTT, les peptides [50-59], [50-60], [50-63], indiquent la présence de trois résidus phosphorylés soit T51, Y55 et S57. Les trois résidus thréonine du peptide [109-121], T111, T112 et T115 semblent être phosphorylés, en effet trois groupements DTT sont ajoutés sur ce peptide. Enfin, une incertitude concernant la phosphorylation du peptide [91-96] est observée.

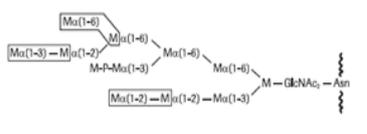
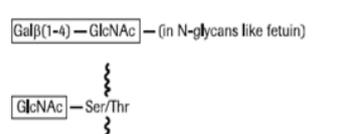
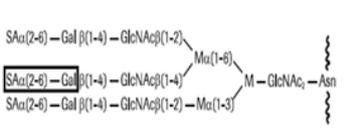
<p style="text-align: center;">GNA Agglutinine <i>Galanthus nivalis</i></p>	<p style="text-align: center;">DSA Agglutinine <i>Datura stramonium</i></p>	<p style="text-align: center;">MAA Agglutinine <i>Maackia amurensis</i></p>
<ul style="list-style-type: none"> - N-glycannes de type « high mannose » - O-glycannes des glycoprotéines de levures 	<ul style="list-style-type: none"> - N-glycannes complex et hybrides - O-glycannes - O-N-acétyl glucosamine 	<ul style="list-style-type: none"> - N-glycannes - O-Glycannes
<ul style="list-style-type: none"> - Mannoses terminaux - Mannoses liés en (1-3), (1-2) et (1-6) 	<ul style="list-style-type: none"> - Motifs Gal-(1-4)GlcNac 	<ul style="list-style-type: none"> - Acides sialiques lié en (2-3) au galactose
		

Tableau B-5 - Tableau répertoriant les différentes lectines utilisées et leurs propriétés de reconnaissance des polysaccharides.

En effet, l'ajout d'un seul groupement DTT est observé alors que deux résidus sérines, S93 et S95, peuvent être potentiellement phosphorylés, avec une forte probabilité prédite pour S95 (0,678). L'utilisation combinée de la trypsine et de la chymotrypsine permettrait de lever cette ambiguïté, comme cela a été le cas pour les phosphorylations de l'OBP porcine (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b).

Ces premières analyses de BEMAD sur l'OBPb haute du MN femelle ont permis de localiser huit sites de phosphorylation : T38/Y39, T51, Y55, S57, S93/S95, T112, T113 et T116 (Figure B-14). Parmi ces phosphorylations, seules deux ont été prédites, Y57 et S95. Le fait de trouver des sites de phosphorylation non prédits est fréquent. En effet, les prédictions sont réalisées à partir d'algorithmes utilisant les séquences peptidiques consensus de protéines connues, en nombre restreint et ne répertorient donc pas toutes les protéines phosphorylées. Les prédictions n'ont donc qu'une valeur indicative. Des résultats similaires ont pu être observés lors de la localisation des sites de phosphorylation de l'OBPp (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b). La présence de phosphorylations sur le résidu T112 du peptide [109-121] indiquerait qu'il s'agit de l'isoforme d'OBPb correspondant à la séquence 1.

```

                                     *
AQEEEEAEQNLSELSGSWRTVYIGSTNPEKIQENGPFRTYFRELVFDDEKGT
* *
VDFYFSVKRDGKWKNVHVKATKQDDGTYVADYEGQNVFKIVSLSRTHL
* * *
VAHNINVDKHGQTTELTELFVKLNVEDEDLEKFWKLTEDKGIDKKNVVN
FLENEDHPHPE

```

Figure B-14 - Localisation des acides aminés phosphorylés sur la séquence 1 de l'OBPb après BEMAD. Les acides aminés phosphorylés sont indiqués par un astérisque. Les deux résidus pour lesquels des incertitudes persistent sont encadrés. Les acides aminés prédits comme phosphorylés par l'analyse *in silico* sont colorés en vert.

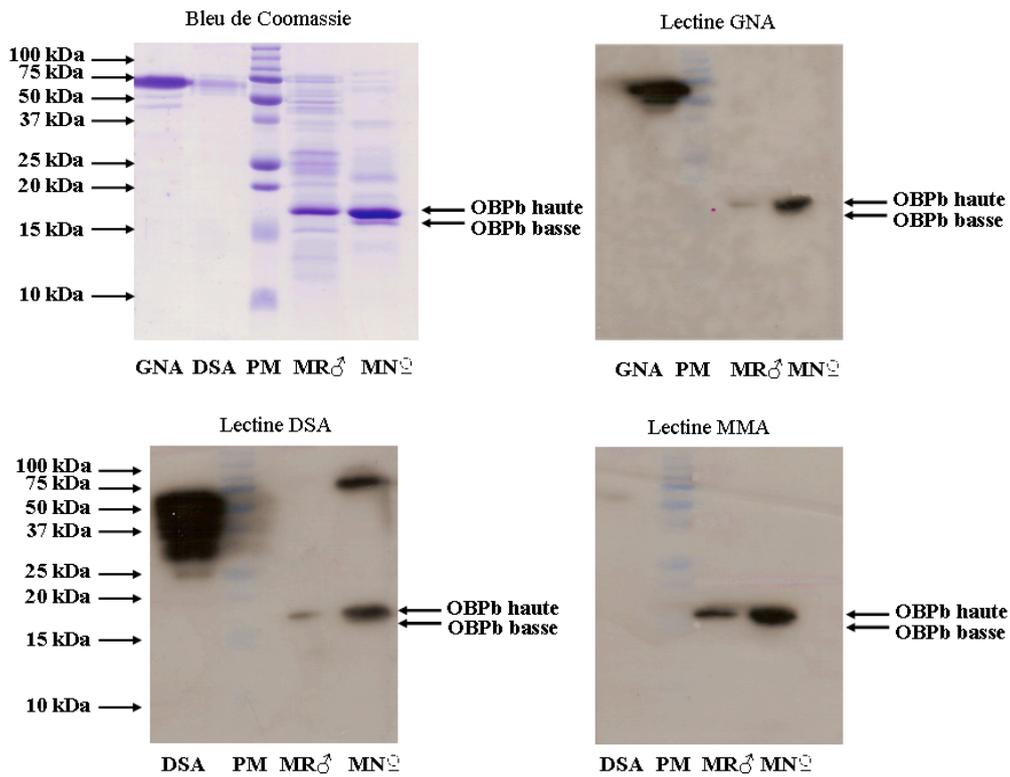


Figure B-15 - Immunodétection des chaînes glycaniques. Utilisation des lectines GNA, DSA et MAA.

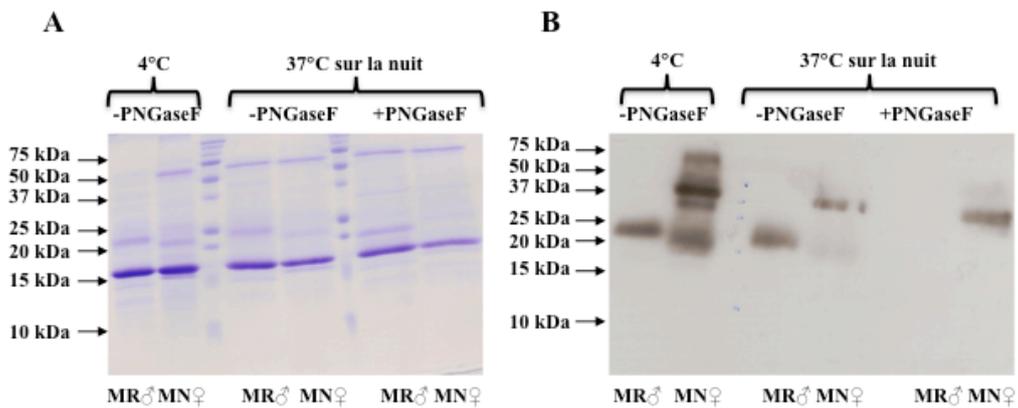


Figure B-16 - Immunodétection des chaînes glycaniques après traitement à la PNGase F. A: Coloration au bleu de Coomassie, B: Western-blot avec la lectine GNA.

V-2-3 - Etude de la glycosylation de l'OBPb

Une coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS, Periodic Acid Schiff), utilisée couramment pour mettre en évidence les polysaccharides de types mucopolysaccharides, n'avait pas révélé la présence de tels groupements à la surface de la protéine purifiée (Bignetti *et al.*, 1985). Suite aux prédictions réalisées *in silico*, la présence de glycanes et particulièrement de *N*-glycanes a été recherchée sur les OBPb des MR et MN mâle et femelle en utilisant des lectines. Les lectines sont des protéines ayant des spécificités de liaison pour les polysaccharides et pour certains motifs composant ces polysaccharides. Le tableau B-5 récapitule l'ensemble des lectines utilisées et leurs spécificités de reconnaissance.

Une première expérience préliminaire réalisée sur la MR mâle et les MN femelle a révélé un marquage de l'OBPb majoritaire par les trois lectines utilisées GNA, DSA et MAA (Figure B-15). En tenant compte de la prédiction bioinformatique, ces premiers résultats semblent indiquer la présence d'une chaîne *N*-glycannique sur l'OBPb majoritaire, chaîne de type « high mannose » avec présence d'acides sialiques (Tableau B-5). La GNA est une lectine qui reconnaît les mannoses terminaux des polysaccharides sans distinction entre *N*- et *O*-glycanes. Pour confirmer les résultats obtenus, un traitement utilisant une enzyme éliminant spécifiquement les *N*-glycanes de la protéine, la PNGase F, a été utilisé. Seule la bande à 25 kDa de la MR mâle montre une différence de profil de migration après traitement à la PNGaseF (Figure B-16A). Cette protéine est donc *N*-glycosylée. En revanche, aucune différence de migration n'est observée au niveau des OBPb. Les marquages lectiniques de ces mêmes échantillons ont confirmé la présence d'un ou de plusieurs *N*-glycanes sur la protéine de 25 kDa (Figure B-16B) et aucun marquage n'est observé au niveau de l'OBPb (ni GNA ni DSA) (Figure B-16B). La répétition de cette expérience (4 fois) a donné des résultats différents avec des marquages non systématiques de la protéine à 25 kD, des marquages pour des protéines de plus haut poids moléculaire et une absence ou un très faible marquage des OBP. Toutes les expériences avec les lectines ont été réalisées sur des aliquots d'extraits tissulaires effectués en même temps et stockés à -20°C jusqu'à leur analyse. Une dégradation des échantillons semble donc être peu plausible, d'autant plus que les migrations sur gel d'électrophorèse ne montrent pas de dégradation apparente des protéines (les profils protéiques étant habituels). Ces résultats non reproductibles suggèrent une hétérogénéité des aliquots protéiques, malgré le soin apporté au moment de la répartition des échantillons. L'existence d'une telle hétérogénéité a déjà été observée au laboratoire lors de l'étude des phosphorylations des OBP des muqueuses respiratoires porcines.

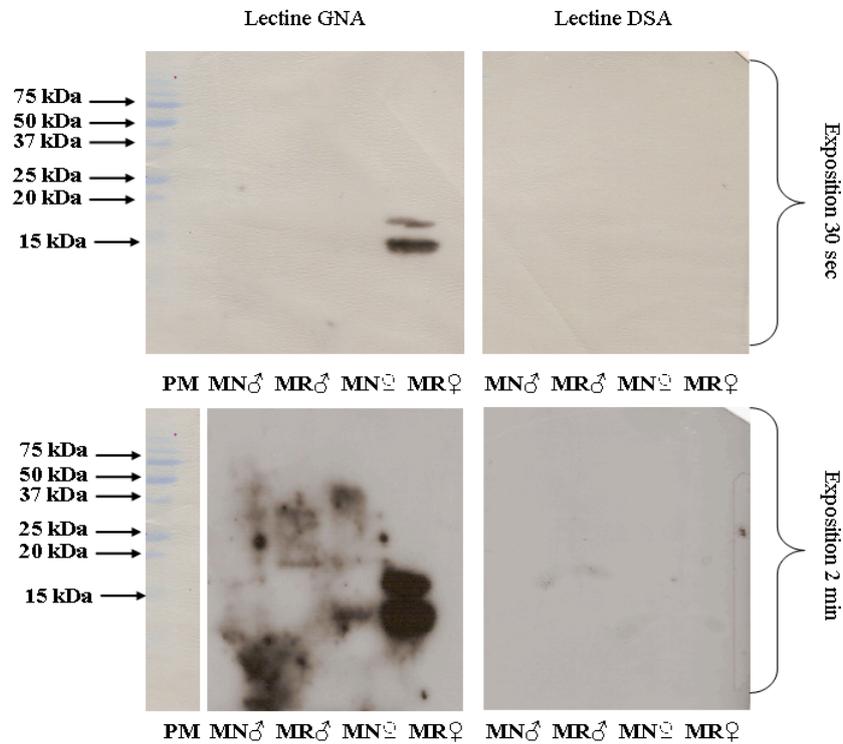


Figure B-17 - Immunodétection des chaînes glycaniques sur un nouveau lot d'échantillon protéique. Utilisation des lectines GNA, DSA.

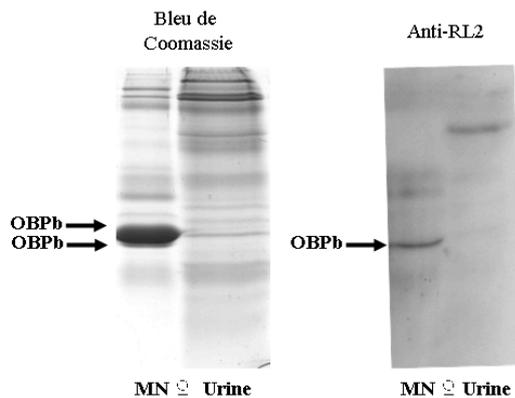


Figure B-18 - Mise en évidence de la présence d'une O-GlcNac sur l'OBPb minoritaire des MN femelle - (A) Séparation des protéines par gel d'électrophorèse SDS-PAGE et coloration des protéines au bleu de Coomassie colloïdal (B) Western-blot avec l'anticorps « RL2 » dirigé contre les résidus O-GlcNac.

Peptide	Masse théorique	Masse expérimentale
19-41	2717.3681	2717.0723
50-63	1618.8223	1618.9710
71-96	2904.4373	2904.0441
97-121	2799.5264	2799.1843
122-134	1664.8166	1664.9767
132-139	1066.5567	1066.7650
145-159	1789.8140	1789.9386
Recouvrement de la séquence		76 .10 %

Tableau B-6 - Analyse par MALDI-TOF MS des peptides obtenus après digestion trypsique de la protéine marquée par l'anticorps RL2. Masses obtenues après élution des peptides par un gradient de concentration en ACN.

Ceci a pu être confirmé par un marquage avec les lectines réalisé récemment sur des échantillons protéiques fraîchement extraits. En effet, pour un temps d'exposition de 30 sec, deux marquages bien nets sont observés avec la GNA : un au niveau de l'OBPb et un sur une protéine migrant un peu plus haut, sur les échantillons de MR femelle (Figure B-17). Un temps d'exposition plus long a également révélé un marquage de l'OBPb des MN femelles (Figure B-17). En revanche aucun marquage spécifique de l'OBPb n'est observé dans les tissus mâles. Aucun marquage par la DSA n'est observé quelque soit le temps d'exposition. Toutefois, aucun témoin positif n'ayant été réalisé pour cette expérience, on ne peut confirmer que le marquage ait bien fonctionné. Cette dernière expérience est à renouveler.

Les marquages lectiniques de l'OBPb, bien que non systématiques, sont toujours observés de façon très nette, ne laissant aucun doute sur la spécificité de la détection. La lectine DSA peut dans certains cas détecter la glycosylation *O*-GlcNac sur les protéines. Bien que cette modification post-traductionnelle n'ait pas été prédite sur l'OBPb, un western-blot utilisant un anticorps spécifique des résidus *O*-N-acétylglucosamine a été réalisé sur les MN femelle et a permis de mettre en évidence un signal sur l'OBP minoritaire (Figure B-18). La *O*-N-acétylglucosaminylation est une glycosylation particulière puisque ne faisant intervenir qu'un seul et unique monosaccharide, la N-acétyl-D-glucosamine. La cartographie peptidique de la protéine marquée par l'anticorps RL2 confirme l'identité de l'OBPb (Tableau B-6). Il semble donc qu'une isoforme de l'OBPb porte un résidu *O*-Glc-Nac comme cela a été démontré pour la VEG porcine (Le Danvic *et al.*, 2009).

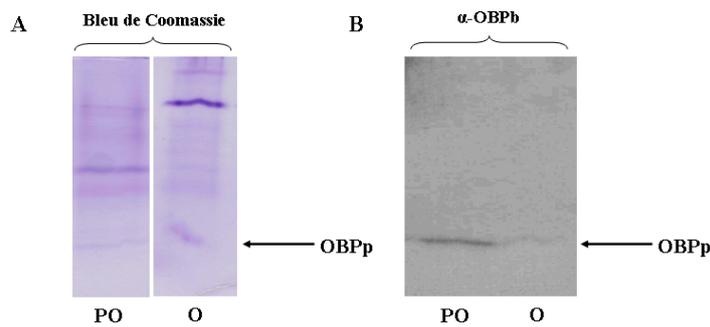


Figure B-19 - Comparaison des profils protéiques urinaires au cours du cycle oestral de la truie. (A) Gel d'électrophorèse SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie colloïdal (B) Immunodétection de l'OBPP dans les urines de truie avec les anticorps spécifiques. PO = pré-œstrus, O = œstrus.

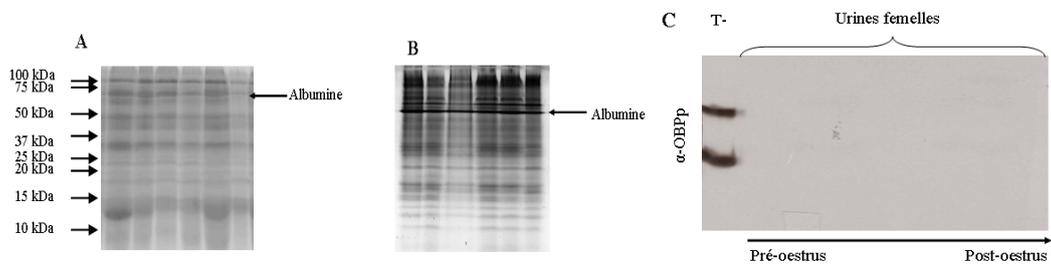


Figure B-20 - Comparaison des profils protéiques urinaires au cours du cycle oestral de la vache. Electrophorèse réalisée en conditions dénaturantes (A) et non dénaturantes (B) des urines d'une vache représentative de l'ensemble des profils observés (C) Immunodétection de l'OBPP dans les urines de vache au cours d'un cycle œstral, «T-» indique le dépôt de protéines extraites à partir de MN mâle servant de témoin positif pour le Western-blot.

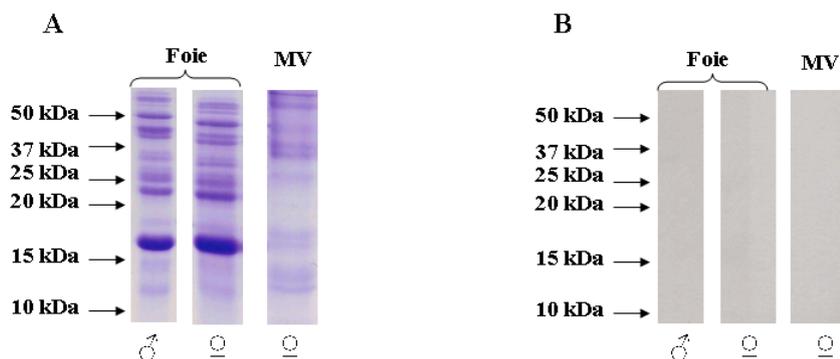


Figure B-21 - Immunodétection de l'OBPP dans les foies mâle et femelle et dans les mucus vaginaux par Western-blot après séparation en conditions dénaturantes.– (A) gel d'électrophorèse coloré au bleu de Coomassie colloïdal, (B) Western-blot. Le temps d'exposition de la membrane au révélateur ECL⁺ (Amersham) est de 30 secondes pour un anticorps anti-OBPP dilué au 30000^{ème}. MV = mucus Vaginaux.

B-II - Recherche de protéines de liaison dans les urines et les mucus cervicaux de vache

B-II-1 - Recherche de l'OBP bovine

Toujours dans l'objectif d'identifier les partenaires chimiques et protéiques impliqués dans les mécanismes de communication chimique mis en place au moment de l'oestrus, et grâce à l'outil précieux que sont les anticorps α -OBPb, la présence d'OBPb a été recherchée dans les urines des vaches au cours d'un cycle oestral, mais aussi dans les mucus cervicaux sécrétés au moment des chaleurs.

Des travaux préliminaires réalisés chez la truie ont permis de mettre en évidence la présence de l'OBPp dans les urines au stade pré-oestrus, par Western-blot avec des anticorps dirigés contre l'OBP porcine (Figure B-19). Ces urines présentent des profils protéiques distincts en fonction du stade où elles ont été collectées (Figure B-19A) alors que la séparation des urines bovines que ce soit en conditions dénaturantes (Figure B-20A) ou non dénaturantes (Figure B-20B) ne montre que peu de variations de profil au cours du cycle de la vache. Les Western-Blot réalisés sur ces urines n'ont pas permis de mettre en évidence d'OBPb (Figure B-20C).

Par analogie avec ce qui est observé chez les rongeurs où les MUP, protéines impliqués dans le transport de phéromones, sont produites dans le foie avant d'être excrétées dans l'urine, l'OBPb a également été recherchée dans le foie des animaux. Aucun signal n'est observé dans les extraits de foie mâle ou femelle (Figure B-21B), que les protéines soient séparées en conditions dénaturantes (Figure B-21A) ou non dénaturantes (données non présentées). Toutefois, on observe une protéine majoritaire de poids moléculaire voisin de 15 kDa sur le gel SDS-PAGE (Figure B-21A). Aucune OBPb n'est détectée dans le mucus cervical, fluide biologique spécifique du stade oestrus (Figures B-21A et B).

Peptide		Masse théorique	Masse expérimentale
7-16		1193,6021	1193,6204
19-26		974,4577	974,5278
88-99		1364,4803	1364,7233
105-112	Cys_CAM :107	1034,4724	1034,5269
143-149		927,4934	927,4632
180-191		1331,7174	1331,7090
203-214	Cys_PAM :205	1478,7896	1478,7817
224-238		1750,9737	1750,8498
268-281	Cys_PAM :270	1698,8367	1698,9907
369-381	Cys_PAM :374	1568,6686	1568,8687
419-433		1639,9377	1640,0815
442-450		1165,4928	1165,6136
465-480	Cys_PAM :466	1882,0466	1882,1364
478-489	Cys_PAM :481-482	1494,7403	1494,7155
490-505	Cys_CAM :492	1880,9211	1880,8833
570-579		1121,5295	1121,5059
Recouvrement de la séquence de l'albumine bovine			31,57 %

Tableau B-7 - Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des peptides obtenus après digestion trypsique de la protéine majoritaire des urines de masse moléculaire comprise entre 50 et 75 kDa. Masses obtenues après élution des peptides à l'aide d'ACN 50%.

B-II-2 - Recherche de l'albumine

Cependant, l'absence d'OBPb dans les fluides des animaux émetteurs ne signifie pas qu'aucune protéine de liaison n'y est présente. En effet, chez l'Eléphant, c'est l'albumine qui assure le transport et la libération de la phéromone d'oestrus dans l'urine (Lazar *et al.*, 2004). Nous avons donc recherché cette protéine dans l'urine de vache. Une séparation des protéines urinaires en conditions non dénaturantes, de façon à conserver un potentiel ligand naturel de la protéine, a été réalisée avec un témoin positif de BSA (Bovine Serum Albumin) commerciale. La protéine migrant de façon similaire à la BSA dans les urines a été soumise à une digestion trypsique. L'analyse des peptides résultants a permis de confirmer la présence de l'albumine dans l'urine avec un recouvrement de 31,57 % (Tableau B-7).

B-II-3 - Extraction des ligands intrinsèques de l'albumine et de l'OBPb

La bande correspondant à l'albumine est découpée dès son apparition lors de la coloration au bleu de Coomassie colloïdal. Une extraction de ligands est ensuite réalisée sur cette bande par broyage dans une solution de chloroforme/méthanol. Ce protocole a été déjà été utilisé avec succès au laboratoire lors de l'identification des ligands naturels des isoformes de VEG chez le porc pré-pubère (Le Danvic *et al.*, 2009). L'analyse par GC/MS des extractions a révélé la présence de plusieurs molécules. Les composés majoritaires retrouvés dans les extractions à partir des protéines sont du TCA et un méthyl ester de TCA (Figure B-22A). Le TCA est utilisé pour fixer les protéines dans les gels, la présence de ces deux molécules a donc été attribuée à des résidus de coloration des gels. Ceci est confirmé par l'absence de ces deux composés dans le témoin négatif, correspondant à l'extraction d'un morceau de gel non coloré. Trois autres molécules spécifiques des protéines ont pu être identifiées : l'oléanitrile, un méthyl ester d'acide octadécénoïque et le (Z)-9-octadécénamide (Figure B-22B). Les mêmes composés ont été extraits à partir de l'OBPb majoritaire du MN femelle (Figure B-22B).

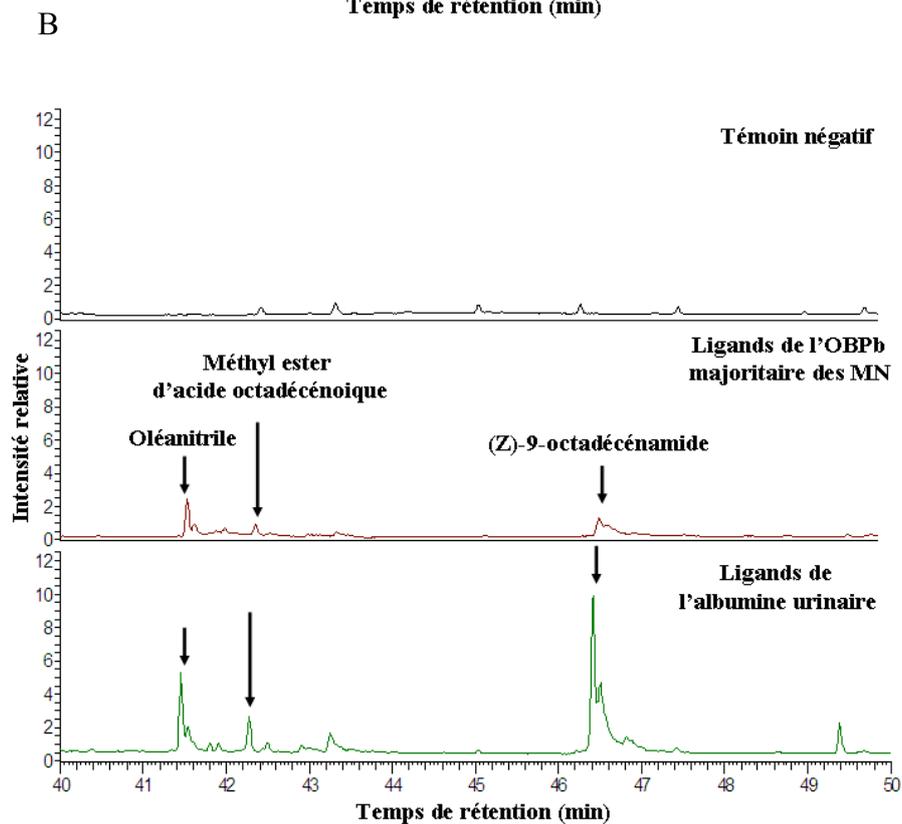
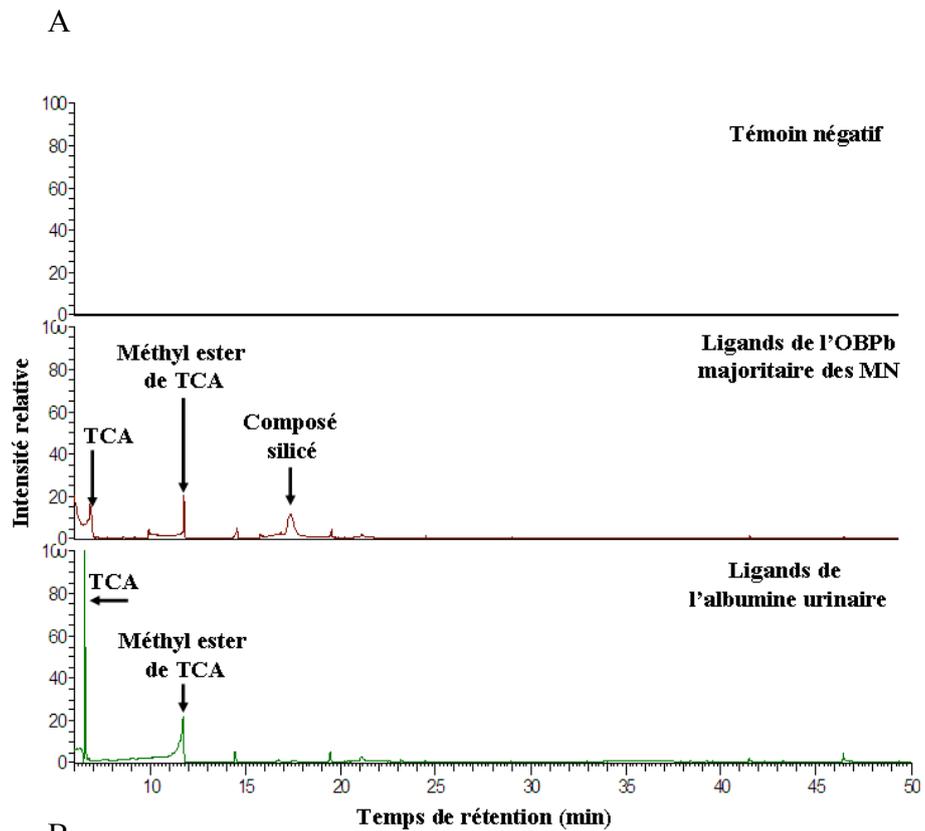


Figure B-21 - Analyse par GC/MS des ligands extraits de l'albumine urinaire bovine et de l'OBPb du mucus nasal. (A) chromatogrammes entiers (B) détail des chromatogrammes de la 40^{ème} à la 50^{ème} min. Les composés identifiés sont indiqués par des flèches.

Les protéines de liaison aux odeurs chez les bovins

Nos résultats confirment que **l'OBPb est la protéine majoritaire des tissus olfactifs** bovins (Pelosi, 1996). Les premières études histologiques avaient permis de localiser cette protéine dans le mucus olfactif ou nasal, dans les glandes de Bowman, ainsi qu'au niveau du mucus et de la muqueuse respiratoire (Pevsner *et al.*, 1986). Les études immunochimiques associées aux cartographies peptidiques réalisées au cours de nos travaux ont permis de montrer pour la première fois que cette protéine est **également présente dans le VNO** chez le mâle et chez la femelle. Le rôle précis de l'OBPb dans le mécanisme de transduction olfactive n'est pas clairement établi, comme pour l'ensemble des OBP. Toutefois, sa présence dans le VNO, organe longtemps considéré comme détecteur des signaux phéromonaux chez les mammifères et sa capacité à lier des petites molécules hydrophobes, de type phéromonal, renforcent l'hypothèse d'un rôle actif des OBP dans le processus de discrimination des odeurs.

Des expériences préliminaires réalisées sur des urines de truie au cours d'un cycle oestral ont mis en évidence pour la première fois la **présence de l'OBPp dans les urines de truie juste avant l'oestrus**. Cette OBP possède la même séquence peptidique que l'OBPp présente dans la zone olfactive, sans que nous sachions si elle porte les mêmes modifications post-traductionnelles. La présence d'une telle protéine dans les urines de truie en proportion variable au cours du cycle suggère qu'elle peut être impliquée dans la liaison de marqueurs odorants de l'oestrus. Elle pourrait avoir le même rôle que les MUP de souris, qui séquestrent et protègent les signaux chimiques dans l'urine, et les libèrent au moment de l'oestrus. Contrairement à ce qui a été observé chez la truie, aucune variation significative des profils protéiques urinaires n'a pu être observée au cours du **cycle oestral de la vache**. De plus, **aucune OBPb n'a été détectée dans ces urines**, à aucun moment du cycle, malgré l'utilisation d'anticorps très spécifiques et sensibles. Cependant, un transcrit de l'OBPb a pu être amplifié dans le foie, son rôle reste à élucider.

L'**albumine** lie la phéromone sexuelle de l'éléphante dans les urines (Lazar *et al.*, 2004). Son homologue a été caractérisé dans l'urine de vache. Nous avons extrait et identifié ses ligands naturels, il s'agit de l'**oléanitrile**, de l'**acide octadécénoïque** et **un de ses méthyl esters**, qui ont également été identifiés à partir de l'extraction des ligands naturels de l'OBPb majoritaire des mucus nasaux femelles.

Microdiversité de l'OBPb dans les tissus olfactifs bovins

Classiquement l'OBP bovine native est purifiée à partir des tissus olfactifs après fractionnement au sulfate d'ammonium par deux étapes chromatographiques successives (Bignetti *et al.*, 1985, Ramoni *et al.*, 2001). Une chromatographie échangeuse d'anions (sur une résine DEAE-cellulose ou sur résine MonoQ) est suivie par une chromatographie en phase inverse. La pureté et la fonctionnalité de la protéine ainsi isolée est vérifiée par électrophorèse en conditions dénaturantes et d'un test de liaison à l'IBMP (Pevsner *et al.*, 1982, Pevsner *et al.*, 1986) ou à une sonde fluorescente couramment utilisée, l'AMA (Paolini *et al.*, 1999, Ramoni *et al.*, 2001). Jusqu'à récemment où deux isoformes de l'OBPb ont été observées dans le mucus bronchoalvéolaire de veaux stressés (Mitchell *et al.*, 2008), une seule isoforme de l'OBPb avait été décrite. Au cours de nos travaux, plusieurs variants de l'OBPb ont pu être mis en évidence et purifiés à partir des tissus olfactifs bovins, par une seule étape de chromatographie échangeuse d'anions sur une colonne ProPac®PA1 (Dionex) à fort pouvoir d'échange anionique. La résine greffée sur cette colonne permet une séparation fine de protéines qui ne peuvent différer que par un seul résidu chargé (un phosphate par exemple ; ProPac® PA1, Manuel Dionex n°032973, 2003, www.dionex.com, Dionex corporation). La nature particulière de sa phase non poreuse lui confère une capacité de résolution supérieure aux résines macro-poreuses classiques, ce qui explique que nous ayons pu isoler différents variants de cette protéine, qui n'avaient jamais été mis en évidence auparavant.

L'OBPb majoritaire femelle ainsi que celle présente dans le VNO, sont de type « GPW » (cartographie peptidique). L'extrémité N-terminale de l'OBPb minoritaire des MN femelle ou celle des mâles n'est ni de type « GPW », ni de type « GSW ». Le séquençage du transcrite codant l'OBPb dans les tissus mâles (MR, VNO et foie) montre la présence d'une protéine de type « GSW ». Il semblerait donc qu'il existe un variant mâle et un variant femelle pour cette protéine. Le séquençage des transcrits de l'OBPb dans les tissus femelles devrait permettre de confirmer cette hypothèse. Récemment des expériences de 5'RACE ont été entreprises de façon à isoler l'extrémité 5' des ARNm codant l'OBPb de façon à vérifier l'existence de variants de séquence peptidique à l'extrémité N-terminale. Jusqu'à présent aucune observation de ce genre n'a été faite, que ce soit par séquençage des protéines ou par cristallographie. Toutefois il faut insister sur le fait que l'ensemble des études répertoriées dans la littérature a été réalisé sur la forme majoritaire de l'OBPb.

Modifications post-traductionnelles de l'OBPb

Les travaux présentés ici ont permis d'isoler **différents variants de l'OBPb** dans les MN et MR, à la fois chez le mâle et chez la femelle. Parmi ces variants, certains portent des **modifications post-traductionnelles** qui n'avaient jamais été rapportées pour cette protéine. Les études d'immunochimie ont permis de mettre en évidence des phosphorylations sur des isoformes minoritaires de l'OBPb. Il semblerait même que ces phosphorylations soient variables en fonction des tissus analysés. Une localisation des sites de phosphorylation par BEMAD a été effectuée sur les deux variants d'OBPb obtenus après séparation des MN femelle par SDS-PAGE. Il a été déterminé que 8 **résidus sont phosphorylés** (S38/Y39, T51, Y55, S57, S93/S95, T112, T113 et T116). La phosphorylation étant une modification post-traductionnelle dynamique, les immunodétections réalisées à partir d'un seul tissu ne permettent pas de généraliser une spécificité de phosphorylation en fonction du sexe de l'animal ni du tissu. Ces identifications sont une image à un instant « t » de l'état de phosphorylation de la protéine. Une autre modification post-traductionnelle dynamique a pu être immunodétectée sur l'OBPb minoritaire MN femelle, une **O-N-acétylglucosaminylation (O-GlcNac)**. Ces résultats sont bien sûr à confirmer, mais ils sont très novateurs et permettent d'évoquer la possibilité d'une régulation de la fonction des OBP (liaison aux signaux chimiques) par la présence ou non de modifications post-traductionnelles dynamiques. En effet, des travaux effectués au laboratoire ont montré que la spécificité de liaison de la VEG porcine pour la testostérone est gouvernée par la présence d'une O-GlcNac sur l'isoforme VEG1 (Le Danvic *et al.*, 2009). Des phosphorylations ont également été localisées sur la VEG et l'OBP porcines (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b), et l'étude de leur **rôle dans la spécificité de liaison de ces protéines avec les signaux chimiques** est en cours.

Phosphorylation et O-GlcNac sont des modifications qui interviennent sur des protéines nucléaires et cytoplasmiques (Hart *et al.*, 2007), et parfois occupent le même site alternativement dans un mécanisme appelé Yin-O-Yang (Slawson & Hart, 2003). Elles n'ont jamais été décrites pour des protéines empruntant les voies de sécrétion, comme les OBP. Si l'existence de kinases membranaires dirigées vers l'espace extracellulaire a été décrite (Walter *et al.*, 1996), rien n'est connu sur une éventuelle O-N-acétylglucosaminylation de protéines extracellulaires. Cependant, les cellules des glandes exocrines qui synthétisent les OBP n'ont pas été étudiées pour ce genre de voies métaboliques.

L'étude des voies métaboliques précises impliquées dans la biosynthèse des OBP est une des perspectives fondamentales de ces travaux.

L'existence d'une ***N*-glycosylation** a pu également être mise en évidence sur l'OBPb majoritaire dans certains tissus. L'identification de la nature de la chaîne glycanique reste à faire. Cependant, étant donné les profils de migration des variants de l'OBPb, il semblerait que la glycosylation portée ne soit pas de très grande taille (quelques sucres seulement). Contrairement aux autres types de MPT décrits ci-dessus, la *N*-glycosylation s'effectue dans les voies de sécrétion, lors de la conformation des protéines dans le réticulum endoplasmique. Elle a été rapportée pour l'aphrodisine (Briand *et al.*, 2000) et pour la SAL porcine (Loëbel *et al.*, 2000), sans que la structure des chaînes glycanes ait pu être déterminée.

Microdiversité et propriétés de liaison de l'OBPb

L'existence d'une variété d'isoformes d'OBP portant des MPT différentes permet de donner un nouvel éclairage sur le rôle de ces protéines dans la liaison, non seulement aux odeurs, mais aussi aux récepteurs olfactifs. La possibilité de régulation des propriétés de liaison des OBP par des MPT dynamiques et donc de la multiplicité d'isoformes avec des propriétés de liaison différentes suggèrent que les OBP constituent la première étape du mécanisme de transduction olfactive, en assurant un tri des signaux chimiques, préalablement à l'interaction spécifique avec le récepteur olfactif. Ces résultats excluent fortement l'hypothèse selon laquelle les OBP ne seraient que des solubilisateurs et des transporteurs des signaux olfactifs, dans l'aire olfactive du moins. En effet, il serait intéressant d'analyser plus précisément l'isoforme d'OBP porcine présente dans l'urine ou d'autres fluides biologiques tels que le lait, le liquide amniotique ou le colostrum (Guiraudie-Capraz *et al.*, 2005a). L'absence de diversité due aux modifications post-traductionnelles serait alors associée à la fonction de transport et de séquestration des signaux chimiques dans les fluides émetteurs.

Chapitre C

Etude des relations structure-fonction OBP/ligands odorants

L'objectif final de mes travaux de thèse est la mise au point de biosenseurs capables de détecter les odeurs associées à l'oestrus de façon systématique et automatisée. L'idée de départ est de mimer le système naturel de détection des odeurs dans les muqueuses, ce qui implique la participation des OBP et des récepteurs olfactifs (RO).

Des biosenseurs utilisant des récepteurs olfactifs exprimés dans des membranes d'organismes hétérologues ont été développés pour étudier l'interaction RO/molécules odorantes (MO ; Zhang *et al.*, 1997 ; Ko & Park, 2005, 2006; Sung *et al.*, 2006). Des interactions tripartites (RO, OBP et MO) ont également été étudiées et montrent que l'OBP augmente la sensibilité des RO aux odeurs présentées (Vidic *et al.*, 2008 ; Ko & Park, 2008). Dans l'une de ces études (Vidic *et al.*, 2008), des nanosomes contenant des récepteurs olfactifs ont été fixés sur des sensor chip, et leurs interactions avec des OBP et des MO ont été mesurées par Résonance Plasmonique de Surface (RPS, technologie BiaCore). L'OBP de rat OBP1-F se fixe sur le récepteur humain OR-1740, et cette liaison est abolie en présence d'héliolal. Cette expérience montre au moins que l'OBP ne peut se lier à la fois au RO et à la MO. Malgré un intérêt évident, la manipulation et l'expression de RO reste problématique, les principaux inconvénients étant leur faible taux d'expression dû à l'adressage incorrect vers la membrane par les systèmes hétérologues utilisés (levure), et le manque d'information sur leur(s) ligand(s) naturel(s).

Les OBP présentent l'avantage de s'exprimer facilement et avec de forts rendements en système hétérologue, en particulier chez la levure *Pichia pastoris* (Briand *et al.*, 2000 ; Guiraudie-Capraz *et al.*, 2005b). Par ailleurs, la fixation de films ou de couches d'OBP de rat (OBP-1F) sur des supports métalliques en or a été réalisée avec succès (films Langmuir-Blodgett, LB), rendant accessible la mise au point et la fabrication de biosenseurs (Hou *et al.*, 2005). Ces travaux ont montré que les OBP fixées sur de tels supports restent fonctionnelles et conservent leur capacité à lier les molécules odorantes, en particulier l'acétate d'isoamyle, un des ligands de l'OBP de rat (Hou *et al.*, 2005). Nous avons donc orienté nos recherches dans cette direction, en nous focalisant sur l'étude des relations structure-fonction entre les OBP et leurs ligands.

Découvertes grâce à leur propriété de liaison des molécules odorantes telle que la 2-isobutyl-3-méthoxy-pyrazine (IBMP, Pelosi *et al.*, 1982), les OBPs ont largement été étudiées pour leurs capacités à lier diverses molécules chimiques. Différentes techniques ont

été mises en place au cours du temps pour la caractérisation des propriétés de liaison de ces protéines. L'approche pharmacologique utilisée lors des premières recherches visant l'identification de récepteurs olfactifs a permis l'identification de nombreuses OBP *via* l'utilisation de ligands radioactifs (Pelosi *et al.*, 1982; Bignetti *et al.*, 1985; Pevsner *et al.*, 1986; Dal Monte *et al.*, 1991). Cette technique a également permis de mettre en évidence des différences d'affinité des OBP chez le porc pour les acides gras et les stéroïdes (Guiraudie *et al.*, 2003). Cette technique n'est que qualitative et ne permet pas de calculer une constante d'affinité entre la protéine et un ligand donné. Des études par microcalorimétrie isotherme, méthodes quantitatives, ont été réalisées sur l'OBPp (Burova *et al.*, 1999) ainsi que sur les OBP-1 et -3 de rat (Loëbel *et al.*, 2001; Nespoulous *et al.*, 2004) afin de déterminer les constantes d'association et d'enthalpie de liaison entre ces protéines et leur(s) ligand(s). Mais la technique utilisée le plus couramment pour l'étude des interactions entre OBPs et ligands est la spectroscopie de fluorescence (Tegoni *et al.*, 2000; Loëbel *et al.*, 2002). La spectroscopie de fluorescence présente l'avantage d'être une méthode très sensible qui ne nécessite pas de quantité de protéines et de ligand trop importantes (de l'ordre du micromolaire) et permet donc un large criblage de molécules.

Le ligand naturel de l'OBPp, cristallisé avec la protéine, a été identifié par Ramoni *et al.* (2001) : il s'agit de l'1-octen-3-ol racémique, qui se lie à l'OBPp dans le rapport d'une molécule par monomère. Les simulations de complexes d'OBP porcine et d'une série de 7 molécules (Vincent *et al.*, 2000) montrent que la molécule odorante se fixe à l'intérieur de la cavité de chaque monomère. Les interactions de types hydrophobe et apolaire sont majoritaires mais l'orientation de molécules structurellement proches (par exemple les aromatiques) est très différente dans chaque complexe. Le spectre de fixation des OBPs porcine et bovine, les plus étudiées, est large (Pelosi, 1998) : une OBP peut fixer plusieurs types de molécules, de préférence hydrophobes et de taille moyenne (9-12 atomes de carbone) avec une forme plane ou susceptible d'adopter une conformation plane. Les composés aromatiques, tels que l'IBMP ou le thymol sont représentatifs des "bons ligands", au même titre que des molécules de conformation plane mais non totalement planaires, telles que la menthone et la carvone, ou que des molécules flexibles comme le 3,7-diméthyl-octanol. Les constantes de dissociation sont de l'ordre du micromolaire, ce qui dénote une interaction relativement faible et peu spécifique. Ces protéines lient un large spectre de molécules chimiques (aliphatiques, aromatiques, terpènes, etc ...) sans réelle discrimination (Tegoni *et al.*, 2000), ce qui a conduit à les considérer comme des transporteurs passifs des MO.

Cependant, la majorité des travaux réalisés jusqu'à maintenant sur les OBP porcine et bovine n'a pas pris en compte l'éventuelle diversité des OBP. Pourtant, il a été démontré que les trois sous-type d'OBP de rat possèdent des profils de liaison aux molécules odorantes spécifiques. Ainsi, l'OBP-1 de rat fixe préférentiellement les hétérocycles, l'OBP-2 les longues chaînes carbonées, des aldéhydes et des acides gras, alors que l'OBP-3 fixe les cycles saturés ou insaturés (Loëbel *et al.*, 2002). Deux variants, juvénile et adulte de l'OBPp ont également été identifiés (Guiraudie *et al.*, 2003). La forme, dite juvénile de l'OBPp (OBPj), est présente dans les muqueuses olfactives et voméronasales du porc pré-pubère. Sa forme adulte (OBPa), présente dans la salive et les muqueuse respiratoires du porc pubère, remplace le variant juvénile et se différencie au niveau de la séquence peptidique par l'absence d'un seul résidu lysine C-terminal (Guiraudie *et al.*, 2003). Toujours chez le Porc, deux variants de la VEG porcine (Von Ebner's Gland protein), la VEG1 et la VEG2, ont des capacités de liaison différentes (Guiraudie *et al.*, 2003). La VEG1 lie les stéroïdes mais pas les acides gras, alors que la VEG2 présente un spectre plus large de liaison. Nous avons identifié les ligands naturels de ces deux isoformes et montré que la spécificité de liaison de la VEG1 pour les stéroïdes est gouvernée par la présence d'un seul sucre, la *O*-N-acétyl glucosamine (*O*-GlcNac) sur la chaîne peptidique (Le Danvic *et al.*, 2009). De même, nous avons mis en évidence dans le chapitre précédent l'existence de plusieurs variants de l'OBPb. Ces variants se distinguent par la présence de modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et la glycosylation. La mise en évidence d'une telle diversité d'OBP suggère que chaque variant pourrait avoir des capacités de liaison spécifiques.

La connaissance des interactions fines entre les partenaires moléculaires, isoformes d'OBP d'une part, et molécules odorantes d'autre part, est un pré-requis à la mise au point des biosenseurs. C'est pourquoi nous avons étudié les modalités de ces interactions sur la base des films LB, en supposant que les OBP seraient fixées sur un support métallique et leurs propriétés de liaison ont été mesurées par RPS. Cette technologie n'ayant pas fonctionné, nous avons ensuite étudié la liaison OBP/MO par spectroscopie de fluorescence, qui permet d'obtenir des constantes thermodynamiques de cette liaison, et donc d'identifier des couples spécifiques protéine/odeur. Afin de ne pas compromettre le projet, nous avons commencé ces études dès le début de la thèse sur une protéine voisine, l'OBP porcine, ce qui m'a permis d'acquérir les bases technologiques nécessaires pour effectuer le même type de travaux sur l'OBP bovine lorsqu'elle a été disponible.

```

Q E P Q P E Q D P F E L S G K W I T
CAG GAA CCT CAA CCT GAA CAA GAT CCC TTT GAG CTT TCA GGA AAA TGG ATA ACC

S Y I G S S D L E K I G E N A P F Q
AGC TAC ATA GGC TCT AGT GAC CTG GAG AAG ATT GGA GAA AAT GCA CCC TTC CAG

V F M R S I E F D D K E S K V Y L N
GTT TTC ATG CGT AGC ATT GAA TTT GAT GAC AAA GAG AGC AAA GTA TAC TTG AAC

F F S K E N G I C E E F S L I G T K
TTT TTT AGC AAG GAA AAT GGA ATC TGT GAA GAA TTT TCG CTG ATC GGA ACC AAA

Q E G N T Y D V N Y A G N N K F V V
CAA GAA GGC AAT ACT TAC GAT GTT AAC TAC GCA GGT AAC AAC AAA TTT GTA GTT

S Y A S E T A L I I S N I N V D E E
AGT TAT GCG TCC GAA ACT GCC CTG ATA ATC TCT AAC ATC AAT GTG GAT GAA GAA

G D K T I M T G L L G K G T D I E D
GGC GAC AAA ACC ATA ATG ACG GGA CTG TTG GGC AAA GGA ACT GAC ATT GAA GAC

Q D L E K F K E V T R E N G I P E E
CAA GAT TTG GAG AAG TTT AAA GAG GTG ACA AGA GAG AAC GGG ATT CCA GAA GAA

N I V N I I E R D D C P A K *
AAT ATT GTG AAC ATC ATC GAA AGA GAT GAC TGT CCT GCC AAG TGA

```

Figure C-1 - Séquences nucléotidique (Numéro d'accèsion GenBank NM_213796.1) et protéique de l'OBP porcine. La lysine C-terminale (Lys158) différenciant les deux variants de l'OBP porcine est surlignée en rouge.

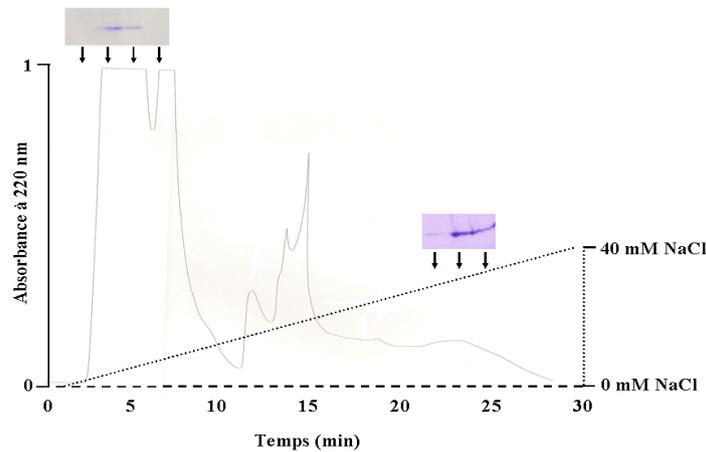


Figure C-2 - Purification du variant adulte de l'OBP porcine recombinant. Purification réalisée par chromatographie échangeuse d'anions. Les fractions collectées sont analysées par électrophorèse en conditions non dénaturantes. Les encarts au-dessus des pics d'intérêt présentent les fractions ayant montré la présence de protéines après coloration au bleu de Coomassie colloïdal.

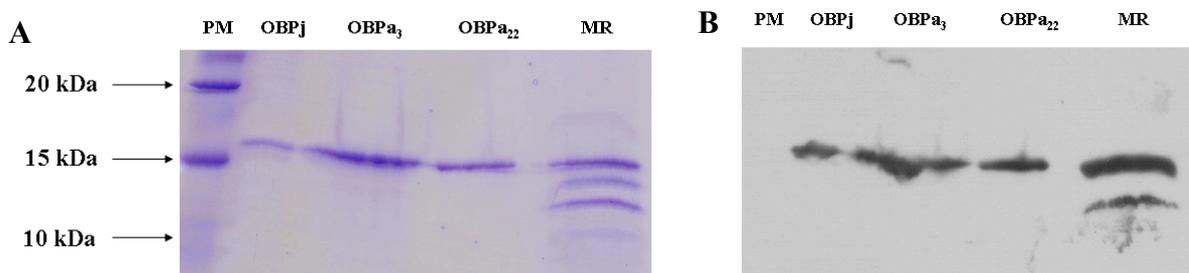


Figure C-3 - Caractérisation des isoformes d'OBPa recombinant. (A) Séparation par électrophorèse en conditions dénaturantes du variant juvénile (OBPj), des variants adultes (OBPa₃ et OBPa₂₂) recombinants et d'un échantillon de muqueuse respiratoire (MR) porcine contenant le variant OBPa (truies gestantes). PM = marqueurs de poids moléculaire, (B) Immunodétection des OBPa avec l'anticorps polyclonal dirigé contre l'OBPj.

C-I - Production des OBP porcines et bovines en système hétérologue *Pichia pastoris*

Afin d'avoir des quantités de protéines suffisantes pour réaliser les expériences de résonance plasmonique de surface et de spectroscopie de fluorescence, nous avons produit les protéines d'intérêt en système hétérologue *P. pastoris*. Pour cela, les séquences d'ADNc codant les OBP porcine et bovine ont été insérées dans le plasmide *pPIC3.5K*. Ce plasmide porte le gène *HIS4* qui complémente le gène *his3* chez la souche GS115 de *P. pastoris*, rendant les cellules transformées capables de pousser sur milieu minimum en absence d'histidine (premier screening des clones ayant intégré l'ADN d'intérêt). Ce plasmide contient également le promoteur du gène de l'alcool oxydase *AOX1*, qui est induit par le méthanol, ainsi que les séquences 5' et 3' *AOX1* qui permettent l'insertion du gène d'intérêt dans le génome de la levure par recombinaison entre les régions homologues du plasmide et celles du génome de *P. pastoris*. La sécrétion de la protéine dans le milieu de culture est réalisée grâce à la présence du peptide signal naturel de la protéine, qui dirige son expression dans le réticulum endoplasmique et vers les voies de sécrétion afférentes.

C-I-1 - Expression des variants juvénile et adulte recombinants de l'OBP porcine (OBPp)

L'OBPp est une protéine constituée de 158 acides aminés (Figure C-1) dans sa forme dite juvénile (OBPj), différant de la forme adulte, l'OBPa (Paolini *et al.*, 1998) par un seul résidu supplémentaire à l'extrémité C-terminale, la Lys158. Ces deux variants de l'OBPp ont été exprimés afin de déterminer si la présence de la Lys158 modifie les propriétés de liaison de la protéine pour différents ligands (thèse de Fanny Brimau en cours au laboratoire), comme cela a été démontré pour l'OBP humaine (Tcatchoff *et al.*, 2006). Les variants ont donc servi de protéines modèles pour mettre au point les expériences de RPS et de spectroscopie de fluorescence.

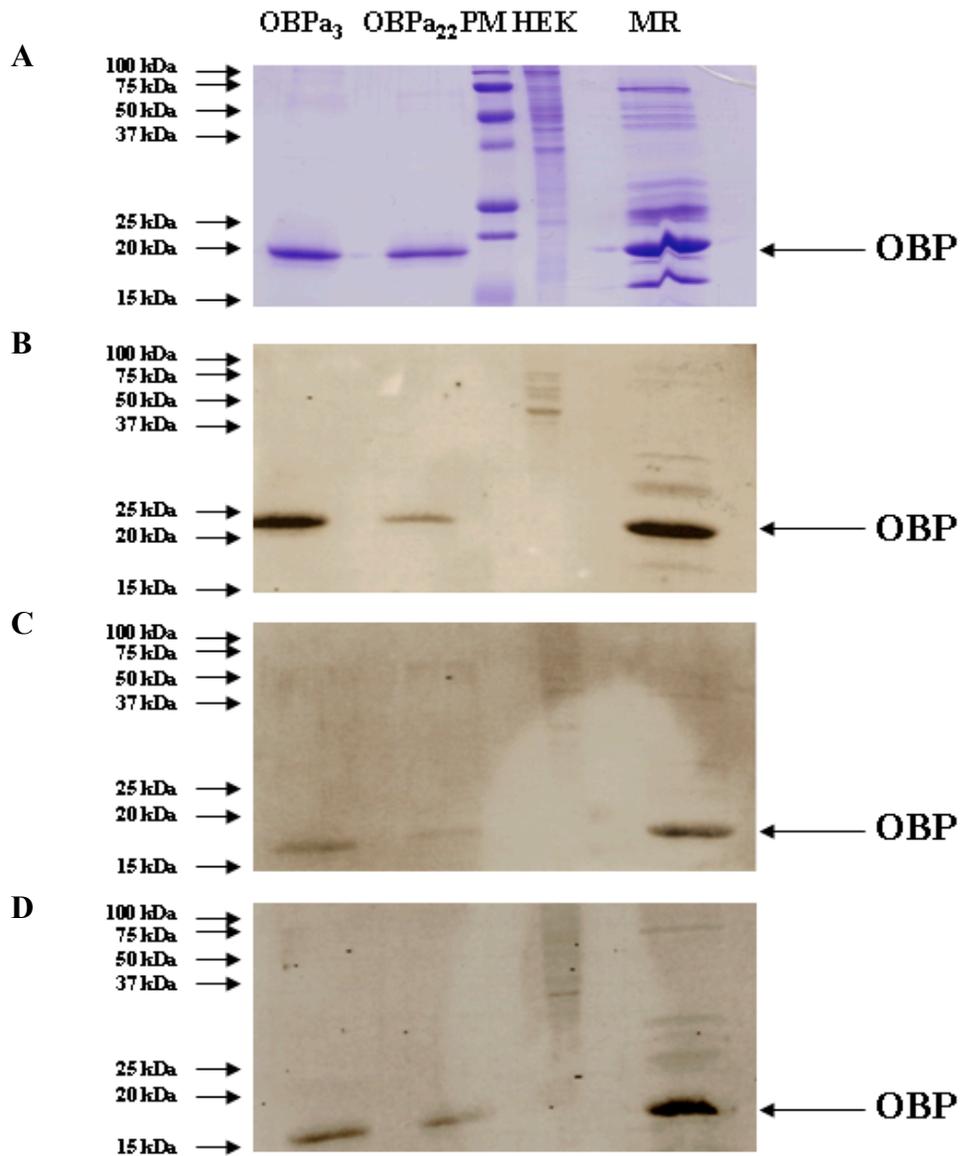


Figure C-4 - Mise en évidence des phosphorylations de l'OBPa. Séparation par électrophorèse en condition dénaturantes des variants adultes (OBPa₃ et OBPa₂₂) recombinants, d'un échantillon de MR porcine et d'un témoin positif (extrait cellulaire HEK 293). (A) Coloration des protéines au bleu de Coomassie colloïdal (PM = marqueurs de poids moléculaire), (B) Western-blot avec les anticorps anti-phosphosérine, (C) Western-blot avec les anticorps anti-phosphotyrosine, (D) Western-blot avec les anticorps anti-phosphothréonine.

C-I-1-1 - Production d'OBPa et d'OBPj recombinantes

A partir de constructions disponibles au laboratoire, j'ai effectué la transformation de la souche GS115 avec l'ADNc codant l'OBPa et l'OBPj. Les différents criblages (cf. "Matériels et Méthodes") ont permis d'isoler des clones fortement producteurs. Les protéines ont été purifiées à partir des surnageants de cultures de 200 mL par HPLC. Après une dernière étape de dialyse extensive, le rendement de production est de 15 mg/L pour l'OBPa et de 19,7 mg/L pour l'OBPj. J'ai vérifié l'intégrité des protéines par migration sur gel d'électrophorèse et par cartographie peptidique. Les protocoles de production, de purification et de caractérisation de l'OBPp, ainsi que les résultats obtenus sont décrits en détail dans la publication issue de ces travaux et jointe en fin de manuscrit (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009a).

C-I-1-2 - Mise en évidence d'isoformes phosphorylées de l'OBPp

Lors de la purification de l'OBPa recombinante par HPLC (Figure C-2), deux pics élués à 3 min (OBPa₃) et à 22 min (OBPa₂₂) présentent un même profil de migration sur gel d'électrophorèse, identique à celui de l'OBPp de la muqueuse respiratoire (Figure C-3A). Ils sont tous deux marqués par les anticorps anti-OBPj (Figure C-3B) réalisés au laboratoire chez le Lapin (P. Nagnan-Le Meillour et J. P. Decottignies). Ces deux isoformes d'OBP ne semblent différer que par leur charge globale nette qui ne peut résulter que de modifications post-traductionnelles. Une recherche dans les banques de données (serveur NetPhos à l'adresse www.expasy.org) indique la possibilité de phosphorylations sur l'OBPa (de même que sur l'OBPj) sur les résidus Ser13, Ser24, Ser41, Ser67 et Tyr82. Des Western-blot préliminaires avec des anticorps anti-phosphosérine, anti-phosphotyrosine et anti-phosphothréonine révèlent la présence de phosphorylations sur l'OBPp native et sur les OBPp recombinantes (Figure C-4, M. Thiant, mémoire de Master Professionnel, 2006). Ces travaux ont été poursuivis dans le laboratoire et ont conduit à une publication (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b, jointe à la fin de ce manuscrit). Les sites de phosphorylations de l'OBPj et de la VEG, une autre protéine de la muqueuse respiratoire de Porc, ont été identifiés. Les deux isoformes OBPa₃ et OBPa₂₂ ont été utilisées pour les tests d'interaction par résonance plasmonique de surface.

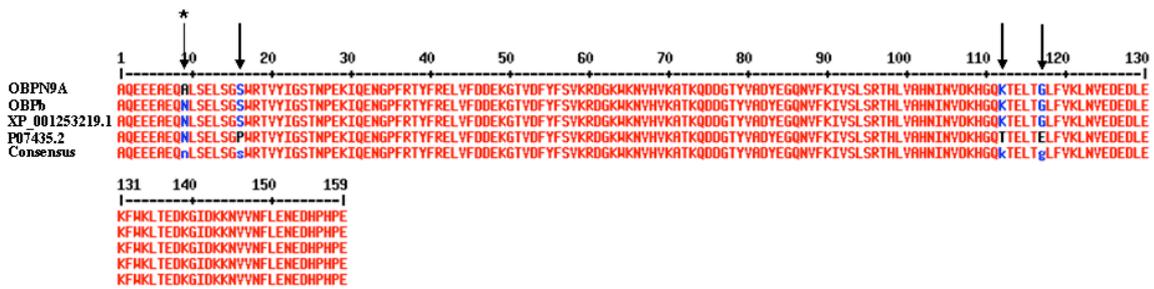


Figure C-5 - Alignement des séquences peptidiques de l'OBP bovine publiées dans GenBank (numéros d'accèsion XP_001253219.1 et P07435.2) et de celles de l'OBP recombinante sauvage (OBPrec) et de l'OBP recombinante mutée (OBPN9rec). L'asparagine mutée en alanine est indiquée par le signe « * », des flèches descendantes indiquent les acides aminés variant entre les deux séquences peptidiques de l'OBPb publiées dans GenBank.

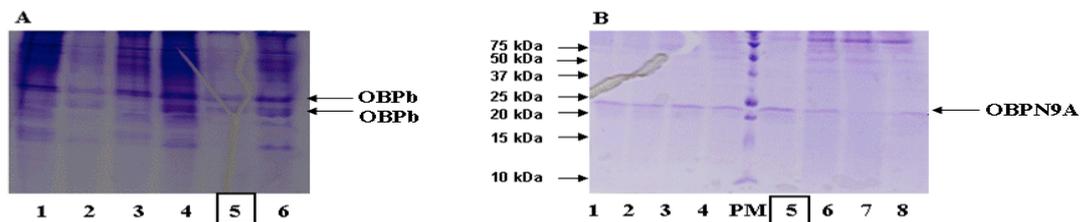


Figure C-6 - Analyse des clones d'OBPb et d'OBPN9A exprimés par *P.pastoris*. (A) Electrophorèse en conditions non-dénaturantes des surnageants de mini-cultures (100 μ l) produisant l'OBPb recombinante, (B) Electrophorèse en conditions dénaturantes des surnageants de mini-cultures (50 μ l) produisant l'OBPN9A recombinante. Les gels d'électrophorèse sont colorés au bleu de Coomassie colloïdal. Les clones retenus pour les productions protéiques en plus gros volume sont encadrés en noir. PM = marqueurs de poids moléculaire.

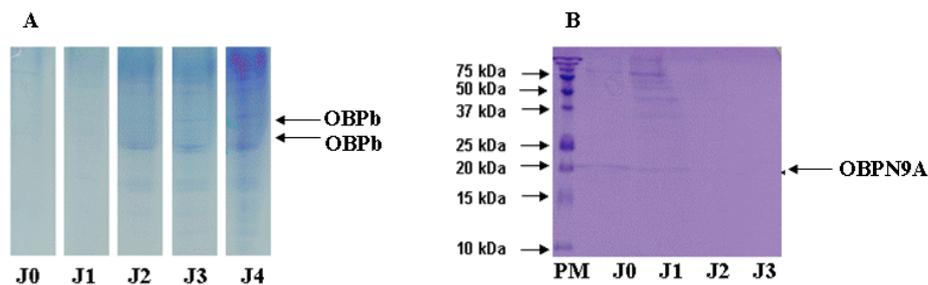


Figure C-7 - Cinétique de production des OBP bovines recombinantes - (A) Cinétique de production de l'OBPb sauvage - Electrophorèse en conditions natives, (B) Cinétique de production de l'OBPn9A- Electrophorèse en conditions dénaturantes.

C-I-2 - Expression de l'OBPb et de son mutant de glycosylation recombinants en système *P. pastoris*

C-I-2-1 - Production des OBPb recombinantes

L'ADN complémentaire codant la séquence de l'OBP bovine a été obtenu par transcription inverse de l'ARN total extrait de muqueuse respiratoire de taureau. Lors de la construction du plasmide recombinant *pPIC3.5K-OBPb*, les sites de restriction *SnaBI* et *AvrII* ont été insérés par PCR, respectivement à l'extrémité 5' et 3' de l'ADNc. Plusieurs clones du plasmide recombinant ont été séquencés et ont confirmé l'insertion de l'ADNc codant l'OBPb après ligation et transformation des bactéries par comparaison de la séquence obtenue avec celles publiées dans GenBank (Figure C-5).

Une mutagenèse dirigée a été réalisée à partir du vecteur *pPIC3.5K-OBPb* pour muter le site de N-glycosylation (Asn9), en transformant le codon de l'asparagine 9 (AAT) en codon de l'alanine (GCT). Le séquençage de plusieurs clones a confirmé cette mutation sur le plasmide résultant *pPIC3.5K-OBPb-N9A* (Figure C-5).

Des cellules de la souche GS115 de *P. pastoris* ont été transformées par électroporation avec les plasmides obtenus. Les clones obtenus ont été sélectionnés par différents criblages (cf. "Matériels et Méthodes"), avant d'être testés pour leur capacité à produire l'OBPb sauvage et l'OBPb mutée, OBPb-N9A. Les clones les plus producteurs (Figure C-6) ont été utilisés pour des productions de 200 ml. Une cinétique de production a alors été réalisée par des prélèvements quotidiens de surnageant effectués jusqu'au dernier jour de culture. Les surnageants de culture sont analysés par électrophorèse (Figure C-7) et les protéines produites sont soumises à une cartographie peptidique pour les identifier. Pour l'OBPb sauvage, l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF indique que les bandes analysées correspondent toutes à de l'OBPb (Tableau C-1). Leurs masses différentes (Figure C-7A, flèches) suggèrent que différentes formes de glycosylation peuvent être présentes, ce genre d'hétérogénéité ayant été rapporté chez la levure *P. pastoris* (Blanchard *et al.*, 2008). Les résultats révèlent également l'absence du peptide N-terminal (1-18) portant le site de N-glycosylation de la protéine sauvage. Ceci renforce l'hypothèse que la protéine recombinante est bien glycosylée.

Aucune accumulation de la protéine recombinante OBPb-N9A n'est observée après mise en culture en volume de 200 ml du clone 9 de l'OBPb-N9A, clone le plus producteur (données non montrées).

Une faible bande protéique à la taille attendue de l'OBPb-N9A est présente au premier et au deuxième jour de culture, mais elle disparaît ensuite (Figure C-7B). Deux autres cultures de 200 mL ont été effectuées en parallèle selon le même protocole avec d'autres clones. Les profils obtenus sont similaires à ceux de la première production. Non seulement il n'y a pas d'induction de la production de protéine par le méthanol, mais les protéines produites constitutivement en faible quantité par la levure semblent dégradées au cours de la production. Faute de temps pour mettre au point la production des OBPN9A, nous avons entrepris leur production en petits volumes (2 ml).

Modification	Peptide	Masse théorique	Masse expérimentale		
			OBPb haute	OBPb basse	OBPN9A
N 9 → A	1-18	2019,9254			2020,1394
	1-18	2062,9312			
	19-37	2150,0876		2150,0994	
	30-37	960,4897	960,0887		
	38-41	586,2984	585,9772		
	50-60	1318,6790		1318,2030	
	50-63	1618,8223			1618,9838
	91-96	674,4195	674,0787		
	91-108	2016,1348			2016,2506
	91-112	2466,3687			2466,9838
	122-134	1664,8166			1664,6485
	122-139	2251,1128	2251,7437		
	145-159	1789,8140		1789,9398	
Recouvrement de la séquence			22,64 %	28,30%	30,19%

Tableau C-1 - Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des peptides obtenus après digestion trypsique des OBPb recombinantes réduites et carboxyméthylées.

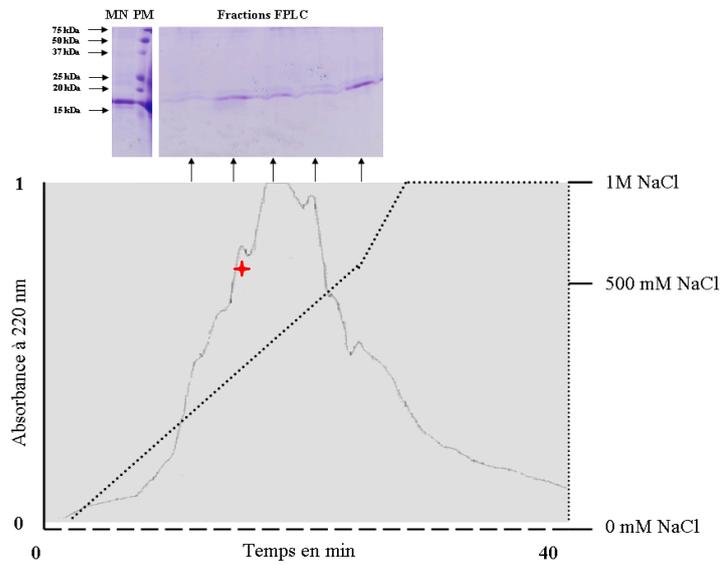


Figure C-8 - Purification de l'OBpb sauvage recombinante - Purification réalisée par FPLC avec une colonne échangeuse d'anions MonoQ. L'encart au-dessus du chromatogramme présente la séparation des protéines des fractions éluées par gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes puis coloration au bleu de Coomassie colloïdal. Le signe « + » indique la fraction utilisée pour les études d'interaction par spectroscopie de fluorescence. MN = mucus nasal, contenant l'OBpb native, PM = marqueurs de poids moléculaire.

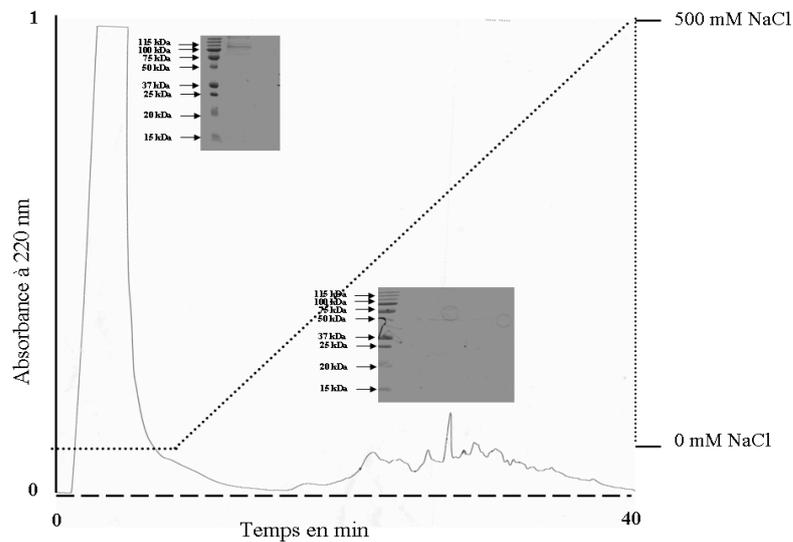


Figure C-9 - Purification de l'OBPN9A recombinante - Purification réalisée par HPLC avec une colonne échangeuse d'anions ProPAC PA1. Les encarts au dessus du chromatogramme montrent la séparation des protéines des fractions éluées par électrophorèse en conditions dénaturantes puis coloration au bleu de Coomassie colloïdal. PM = marqueurs de poids moléculaire.

C-I-2-2 - Purification des OBPb recombinantes

L'OBPb sauvage recombinante a été purifiée après dialyse des surnageants de culture par chromatographie échangeuse d'anions FPLC sur colonne MonoQ (Figure C-8). Le surnageant de culture ne contient que de l'OBP. Les fractions collectées sont analysées par électrophorèse: des protéines de poids moléculaire compris entre 15 et 20 kDa sont présentes dans l'ensemble des fractions collectées (Figure C-9). Ces protéines purifiées migrent un peu plus haut que l'OBP native des mucus nasaux femelle. On remarquera que pour les dernières fractions, deux bandes protéiques de masses moléculaires différentes sont collectées. La nature des protéines a été vérifiée par cartographie peptidique, permettant un recouvrement de la séquence peptidique de l'OBPb native compris entre 50,22% et 63,5% (Tableau C-2). Le peptide N-terminal, portant le site de glycosylation, n'est retrouvé pour aucune des cartes peptidiques réalisées, ce qui peut traduire la présence de plusieurs variants glycosylés de l'OBPb sauvage recombinante. Ces différents variants sont élués entre 290 et 500 mM de NaCl, sans réelle discrimination. L'utilisation d'une colonne conduisant à une meilleure séparation doit être envisagée pour les productions ultérieures.

L'OBPN9A a été purifiée à partir de 10 cultures de 2 ml. Les surnageants de ces dix cultures ont été regroupés, dialysés et purifiés en deux étapes successives de purification par chromatographie échangeuse d'anions FPLC sur colonne MonoQ, puis par HPLC (système Dionex) sur une colonne ProPAC PA1. Deux pics majoritaires sont visibles sur le chromatogramme présenté figure C-9. Le dépôt sur gel des fractions collectées montre la présence d'une protéine de poids moléculaire proche de 100 kDa dans la première fraction, tandis que la protéine éluée à 26,30 min migre à la position d'environ 20 kDa. Après cartographie peptidique, un recouvrement de 54,6 % de la carte peptidique théorique de l'OBPb a pu être obtenu. Cette cartographie peptidique, associée à la vérification de la séquence nucléotidique insérée dans le plasmide ayant servi à transformer la souche GS115, confirme bien la nature de l'OBPN9A.

C-II - Etude des interactions OBP/ligands odorants par résonance plasmonique de surface (RPS)

(N. B. : l'utilisation de cette technologie n'ayant pu aboutir, les résultats obtenus sont discutés au fur et à mesure de leur exposé.)

C-II-1 - Immobilisation des protéines sur Sensor chip

C-II-1-1 - Le Sensor chip CM5

Dans un premier temps, nous avons essayé d'immobiliser les protéines sur un sensor chip CM5, qui est le plus couramment utilisé. Ce sensor chip est constitué d'un support de verre recouvert d'un film d'or de 50 nm sur lequel est greffée une matrice de dextran de 100 nm d'épaisseur. Cette matrice est un gel non réticulé hydrophile, permettant un couplage direct et covalent du ligand (ici les protéines recombinantes) par l'intermédiaire des groupements carboxyles des chaînes de dextran, activés en esters-NHS semi-stables et pouvant réagir avec les fonctions amines des protéines. Les liaisons ont lieu, dans un premier temps, par attraction électrostatique entre les charges négatives du dextran activé et les charges positives des protéines (NH_2^+) qui forment, dans un deuxième temps, des liaisons covalentes avec les dextrans. Pour être chargée positivement, la protéine doit être en solution dans un tampon de pH inférieur à son point isoélectrique (pI). Les OBP porcines, tout comme les OBP en général, sont des protéines acides de faible pI (4,23 et 4,18 respectivement pour l'OBPj et l'OBPa) nécessitant une solubilisation dans un tampon de pH non compatible avec une immobilisation à la surface du sensor. Nous n'avons donc pas réussi à fixer les OBP porcines sur le Sensor chip CM5.

C-II-1-2 - Le Sensor chip SA

Nous nous sommes orientés vers un autre type de Sensor chip : le Sensor chip de type SA. Ce Sensor chip correspond à un CM5 où de la streptavidine est greffée sur les chaînes de dextran. Ce type de sensor est utilisé pour fixer de façon non-covalente des ligands biotinylés en raison de la forte affinité de la biotine pour la streptavidine. Les OBP recombinantes purifiées ont donc été biotinylées sur leurs résidus de lysine (11 Lys, plus la Lys158 pour l'OBPj). Le taux de biotinylation des OBP recombinantes a été déterminé à l'aide d'un « test HABA » qui permet de calculer le nombre de moles de biotine par mole de protéine. Les OBPj, OBPa₃ et OBPa₂₂ ont présenté des taux de biotinylation de 1,49, 0,7 et 1,48, respectivement. Ces taux de biotinylation sont 5 fois supérieurs à ceux recommandés par le fournisseur du kit. Les protéines biotinylées ont été immobilisées sur un sensor chip SA selon

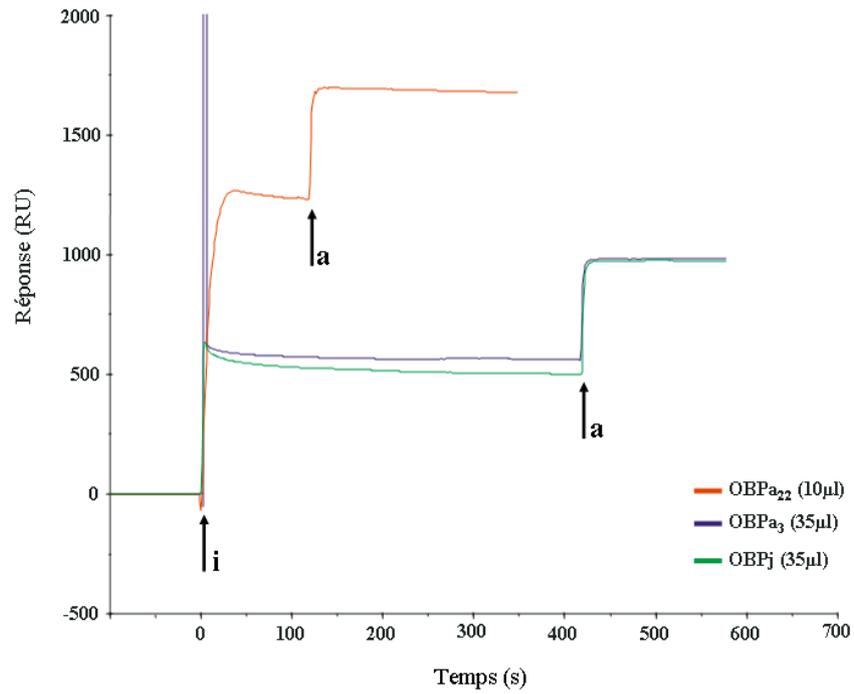


Figure C-10 - Immobilisation des variants biotinylés de l'OBP (300 $\mu\text{g/ml}$) sur sensor chip SA. Le début (i) et l'arrêt (a) de l'injection sont indiqués par des flèches ascendantes. Les courbes d'immobilisation sont obtenues par injection de 10,5 μg d'OBP_j et d'OBP_{a3}, et de 3 μg de d'OBP_{a22}.

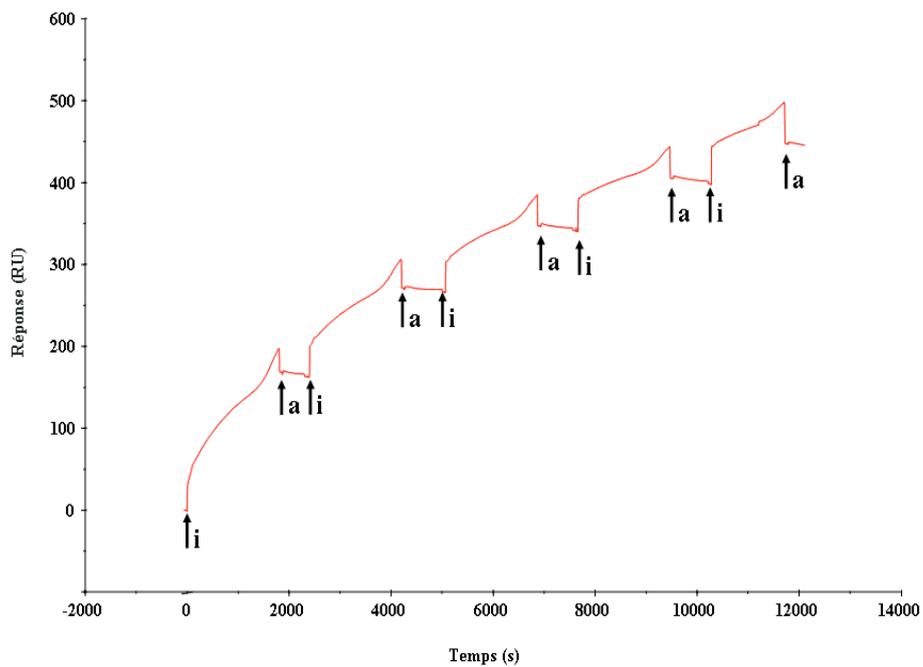


Figure C-11 - Immobilisation de l'OBP_j sur le sensor chip AU

le protocole décrit dans les « Matériels et Méthodes ». La Figure C-10 montre les profils d'immobilisation des trois OBP porcines recombinantes. L'OBP_j et l'OBPa₃ montrent un profil d'immobilisation classique sur ce type de sensor avec une nette augmentation de la réponse en RU (1000 unités), suivie d'une saturation (Figure C-10). L'OBPa₂₂ s'est fixée avec un niveau supérieur (1250 RU) à celui recommandé par le fournisseur (1000 RU) pour ce type de sensor chip, ce qui nous a contraints à limiter sa durée de présentation au sensor chip (120 sec au lieu de 410 sec). Cette différence importante de profil de fixation ne peut pas être expliquée par le taux de biotinylation de la protéine. En effet, l'OBPa₂₂ présente un taux de biotinylation similaire à celui de l'OBP_j, qui a un profil d'immobilisation moins intense et similaire à celui de l'OBPa₃, pourtant beaucoup moins biotinylée. En revanche, l'OBPa₂₂ se différencie des deux protéines par sa charge nette. C'est d'ailleurs grâce à cette charge nette, qui reflète un patron de phosphorylations différentes de l'OBPa₃, que nous avons pu l'isoler par chromatographie échangeuse d'anions. La présence de ces modifications post-traductionnelles influe sur le pI de la protéine. Cette différence de charge nette de l'OBPa₂₂ par rapport à celles de l'OBPa₃ et de l'OBP_j pourrait expliquer son profil d'immobilisation particulier.

C-II-1-3 - Le Sensor chip AU

Un troisième type de sensor chip a été également testé : le sensor AU. Les sensor chips AU sont constitués uniquement d'une surface d'or, ce qui les rapproche du support utilisé par Hou *et al.* (2005) pour la constitution des films LB, sur lesquels les protéines sont immobilisées par adsorption directe. Par injections successives d'OBP_j reprise dans un tampon HBS à un flux de 5 µl/min, nous avons réussi à fixer 450 RU de protéine (Figure C-11).

C-II-2 - Etude des interactions entre les OBP porcines recombinantes et les ligands odorants

Dans ses travaux de thèse, G. Guiraudie (2003) a montré, à l'aide de ligands radioactifs, qu'il existe une sélectivité de liaison de l'OBP porcine recombinante pour différents acides gras et pour deux stéroïdes, l'androsténol et la progestérone. Ainsi, l'androsténol présente une forte affinité pour l'OBP_j recombinante, au contraire de la progestérone, qui a peu d'affinité pour la protéine. Nous avons entrepris l'étude des interactions des différentes isoformes d'OBP porcines recombinantes avec un stéroïde de forte affinité, l'androsténol, et avec un

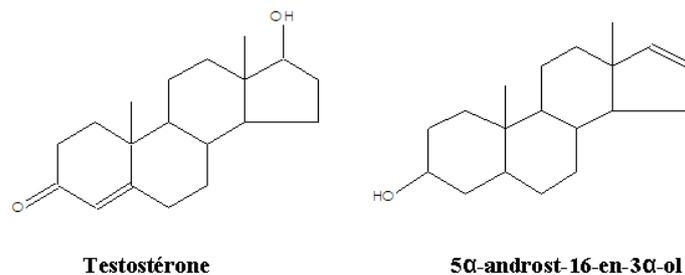


Figure C-12 - Structure chimique des ligands utilisés pour les tests d'interaction des OBP porcines recombinantes fixées sur sensor chip SA et sur sensor chip AU.

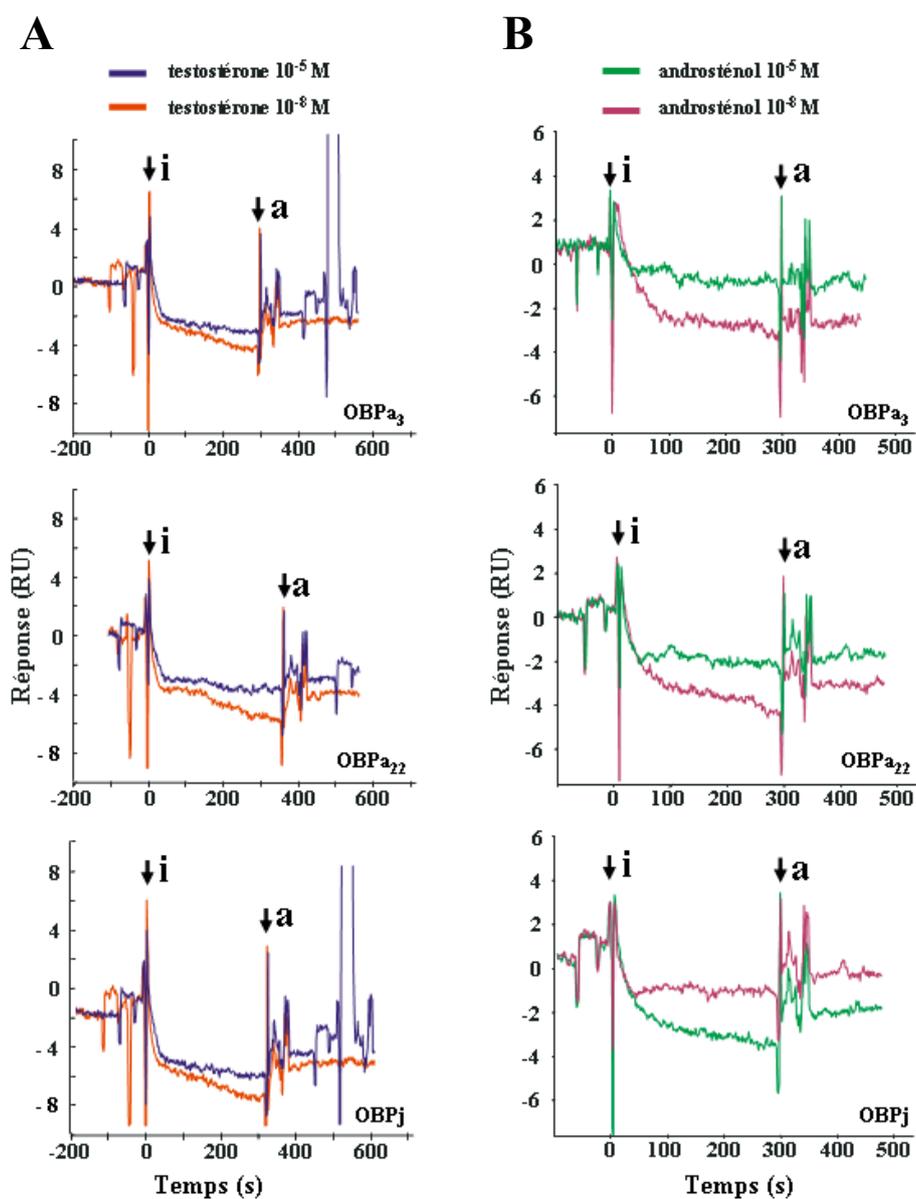


Figure C-13 - Etude par RPS de l'interaction des trois variants de l'OBPp recombinants fixés sur sensor chip SA avec les ligands. (A) Sensorgrammes obtenus après injection de 25 μ l de solution de testostérone 10^{-5} et 10^{-8} M, (B) Sensorgrammes obtenus après injection de 25 μ l d'androsténol 10^{-5} et 10^{-8} M. Le début «i» et l'arrêt «a» de l'injection de ligands sont indiqués sur chaque sensorgramme par une flèche descendante.

stéroïde de structure chimique proche de la progestérone ayant une faible affinité pour la protéine, la testostérone (Figure C-12).

C-II-2-1 - Etude des interactions sur Sensor chip SA

Comme le montrent les sensorgrammes de la Figure C-13, aucune interaction n'est observée, quelque soit la protéine étudiée, le ligand ou la concentration de celui-ci. En effet, suite à l'injection des différents ligands, seule une légère diminution de la ligne de base est observée. Cette diminution est d'autant plus importante que la concentration de ligands est faible. Un retour à la ligne de base n'est observé qu'après quelques minutes d'injection de tampon de course (« run buffer ») (données non montrées). Il est à noter qu'aucune cellule de référence n'a été utilisée pour ces expérimentations. Une telle cellule où une protéine présentant des propriétés physico-chimiques similaires à l'OBP biotinylée aurait été immobilisée, nous aurait permis de certifier que l'absence de fixation des ligands est spécifique des OBP recombinantes.

Lors de ces expérimentations, les OBP recombinantes présentent un taux de biotinylation élevé, qui, associé à la capacité de la streptavidine greffée sur les chaînes de dextran à fixer jusqu'à 4 molécules de biotine, laisse supposer une fixation importante d'OBP, limitant les mouvements intra-moléculaires et empêchant ainsi l'accès du ligand au site de liaison. En effet, l'entrée du ligand dans la poche hydrophobe de la protéine implique des mouvements de résidus d'acides aminés. Ainsi, l'implication de la tyrosine 82 dans la fixation du ligand a été suggérée par des expériences de dynamique moléculaire (Golebiowski *et al.*, 2007). Nos travaux récents (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009a) ont permis de démontrer que la Tyr82 et la Phe35 sont des résidus clef puisqu'ils déterminent l'accessibilité du ligand à la poche hydrophobe de liaison, en opérant des rotations au contact du ligand. En effet, les protéines recombinantes mutées pour ces deux acides aminés (simple mutant et double mutant) perdent leur capacité à lier l'AMA, sonde fluorescente classiquement utilisée pour l'étude des interactions entre les OBP et leurs ligands potentiels. Ainsi, l'entrée et la sortie du ligand du site de liaison des OBP sont conditionnées par les mouvements de résidus d'acides aminés. Sur sensor chip SA, qui implique une fixation de la protéine par plusieurs résidus de Lys, il semble que la molécule soit rigidifiée et ne puisse plus se lier, même à un ligand très affiné comme l'androsténol.

C-II-2-2 - Etude des interactions sur Sensor chip AU

Comme précédemment, nous avons étudié les propriétés de liaison de l'OBPj immobilisée avec les ligands, androsténol et testostérone, à une concentration de 10^{-5} M. Les sensorgrammes de la cellule OBPj et de la cellule de référence (Figures C-14A et C-14B) présentent des profils similaires, avec une augmentation de la fixation en réponse à l'injection de ligand. On peut donc émettre l'hypothèse que cette fixation a lieu sur le support en or de la cellule, et non pas sur la protéine.

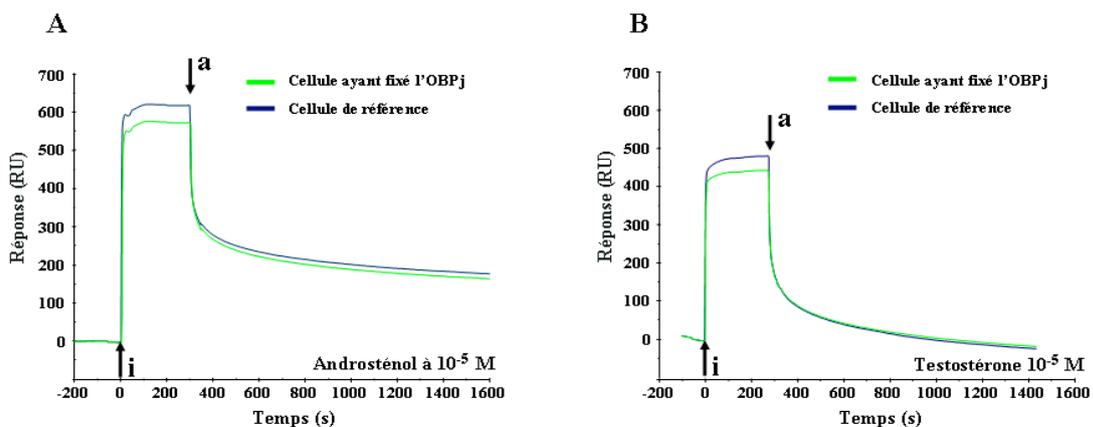


Figure C-14 - Etude par RPS des interactions entre l'OBPj recombinante fixée sur sensor chip AU (200 μ g/ml) et les ligands odorants. Sensorgrammes obtenus après injection de 33 μ l d'androsténol 10^{-5} M (A) et de testostérone 10^{-5} M (B) sur la cellule ayant fixé l'OBPj et sur la cellule de référence. Le début et l'arrêt des injections de protéine et de ligands sont indiqués par des flèches, ascendante « i » et descendante « a », respectivement.

L'ensemble de ces expérimentations par RPS ne nous a pas permis d'obtenir un système "sensor-protéine" compatible avec l'analyse des interactions protéine-ligand qui était attendue.

	λ_{ex} 295 nm		λ_{ex} 380 nm	
	Bandes d'émission de fluorescence observées	328 nm	RAMAN	437 nm
344 nm		OBPb		
370 nm		OBPb		
395 nm		anthracène		
480 nm		AMA + OBPb	480 nm	AMA + OBPb
566 nm		AMA libre	566 nm	AMA libre

Tableau C-3 - Longueurs d'onde des différentes bandes obtenues après décomposition des spectres de fluorescence de l'OBPb et de l'AMA (longueurs d'onde d'excitation λ_{ex} de 295 nm et 380 nm).

C-III - Etude des propriétés fonctionnelles de l'OBPb native et des OBPb recombinantes par spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est une technique utilisée classiquement pour l'étude des propriétés d'interaction des OBP avec des ligands. La fluorescence intrinsèque d'une protéine est principalement due à la présence de tryptophane dans sa séquence peptidique. La liaison d'un ligand avec une protéine n'affectera la fluorescence de ces résidus que s'ils sont situés au niveau du site de fixation, en modifiant son environnement ou en le masquant. Dans le cas de l'OBPb, les résidus tryptophanes sont éloignés du site de liaison et ne montrent pas de mouvement suffisant pour engendrer une variation de fluorescence notable lors de la liaison du ligand. La fixation d'une molécule n'entraîne donc pas ou peu de changement de fluorescence de la protéine. L'interaction OBP-ligand est donc étudiée de façon indirecte. Les mesures d'affinité OBPb-ligands sont réalisées par compétition avec une sonde fluorescente (possédant un signal de fluorescence beaucoup plus intense que celui des tryptophanes intrinsèques de la protéine). La fixation de la sonde dans le(s) site(s) de liaison de la protéine peut être suivie par mesure de sa fluorescence au fur et à mesure de sa liaison avec la protéine. La sonde libre et la sonde liée à la protéine présentent des émissions très distinctes, notamment en longueur d'onde. Lors de l'ajout de ligands, on observe un déplacement de la sonde et donc une diminution du signal de fluorescence de la sonde liée, et une augmentation de l'intensité d'émission de la sonde libre. Des mesures de fluorescence pour différentes concentrations de ligands permettent alors de déterminer une valeur d'IC₅₀, correspondant à la concentration en ligand nécessaire pour faire diminuer l'intensité de fluorescence à 50% de sa valeur initiale.

La sonde utilisée au cours de nos expérimentations est le 1-aminoanthracène (AMA), utilisée classiquement pour l'étude des interactions des OBP bovines natives et recombinantes par spectroscopie de fluorescence (Ramoni *et al.*, 2001 ; Ramoni *et al.*, 2002). Des mesures d'émission de fluorescence ont été faites pour deux longueurs d'onde d'excitation différentes, 295 nm et 380 nm pour chacune des protéines testées. Une excitation à 295 nm, correspondant au maximum d'adsorption du tryptophane permet d'enregistrer simultanément l'émission de la protéine et de la sonde, tandis qu'une excitation à 380 nm correspondant au maximum d'adsorption de l'AMA ne permet de visualiser que la fluorescence de la sonde. Pour chacune des mesures effectuées, l'ensemble des spectres obtenus pour une protéine et des concentrations croissantes d'AMA a été normalisé en fonction de la bande Raman de

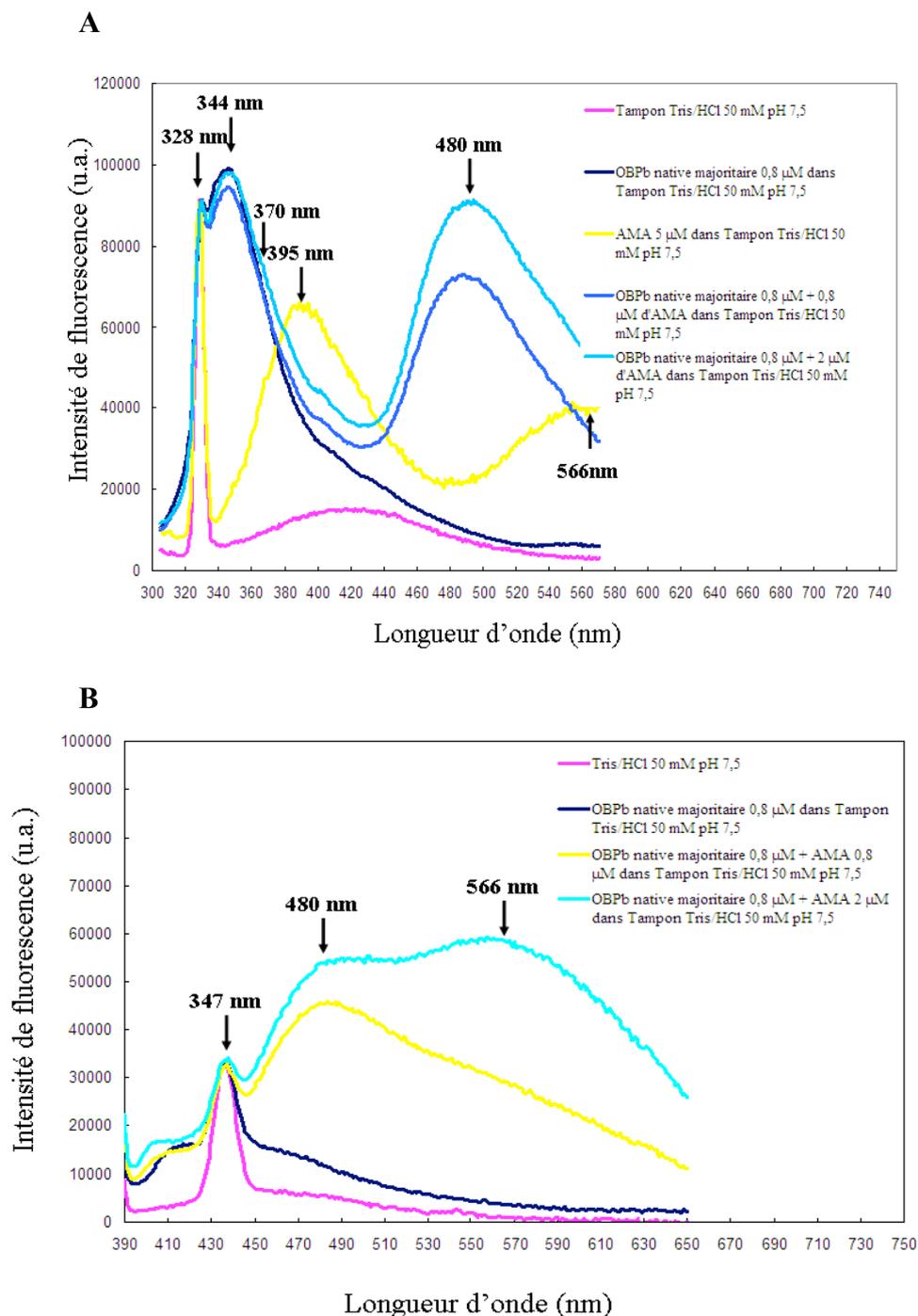


Figure C-15 - Spectres d'émission du tampon Tris/HCl, de l'AMA et de l'OBPb native majoritaire seule, en présence de 0,8 et 2 μM d'AMA aux longueurs d'onde d'excitation 295 nm (A) et 380 nm (B). L'OBPb a une concentration de 0,8 μM (calcul de la concentration avec $\epsilon = 47000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La correspondance des longueurs d'onde indiquées sur les spectres est répertoriée dans le tableau C-3.

l'eau à 328 nm (Nagnan-Le meillour *et al.*, 2009a). Pour cela, les spectres relativement complexes (présentant plusieurs bandes d'émission de fluorescence) (Figure C-15 ; Tableau C-3) ont été décomposés grâce au logiciel NGS LabSpec après conversion en nombre d'onde. La décomposition d'un spectre permet d'individualiser chaque bande d'émission spécifique et donc d'attribuer une intensité de fluorescence à chaque molécule présente dans le tampon (Tableau C-3).

Les spectres obtenus avec une excitation à 295 nm, longueur d'onde spécifique des résidus tryptophane de la protéine, ont été utilisés pour réaliser la titration de l'AMA (concentration d'AMA fixé dans la protéine en fonction de la concentration totale d'AMA dans la solution protéique) après conversion en nombre d'onde et décomposition. Une bande d'émission à 328 nm est observée pour l'ensemble des spectres. Cette bande, correspondant au Raman de l'eau, est utilisée pour normaliser l'intensité de l'ensemble des spectres. L'émission de fluorescence à la fois de l'OBPb, de l'AMA fixé à la protéine, et de l'AMA libre, peut être observée aux longueurs d'onde 344 nm, 480 nm et 566 nm, respectivement (Figure C-15A). La bande de longueur d'onde d'émission à 395 nm correspond au groupement anthracène de l'AMA. La longueur d'onde à 380 nm correspond à la longueur d'onde d'excitation pour laquelle l'émission de fluorescence de l'AMA atteint un maximum. Les spectres obtenus après une excitation à cette longueur d'onde permettent une meilleure visualisation de la complexation de la protéine avec l'AMA (Figure C-15B) par rapport à la longueur d'onde d'excitation à 295 nm qui ne permet pas de distinguer clairement l'AMA libre de l'AMA complexé avec la protéine.

C-III-1 - Tests de fixation de l'AMA pour les différents variant de l'OBPb

L'affinité de la sonde AMA a été mesurée pour deux variants de l'OBP bovine purifiée à partir de la MR mâle (Fraction 4 et 5, correspondant à l'OBPb minoritaire et majoritaire, Figure B6-B) et pour les deux OBP bovines recombinantes, sauvage et mutée sur le site de glycosylation (N9A).

Une fluorescence observée à 480 nm avec une excitation à 380 nm, caractéristique de l'AMA fixé à la protéine, est observable uniquement pour l'OBPb native majoritaire (Figure C-16). L'apparition d'une fluorescence à 566 nm, caractéristique de l'AMA non fixé, est observable. A partir d'une concentration de 0,8 μ M d'AMA ajouté dans la cuve, la fluorescence de la protéine + AMA à 480 nm n'augmente plus, par contre la fluorescence à 566 nm, caractéristique de l'AMA libre dans le tampon continue à augmenter. Ceci reflète la saturation des sites de fixation de la protéine par l'AMA, qui est ensuite accumulé dans le

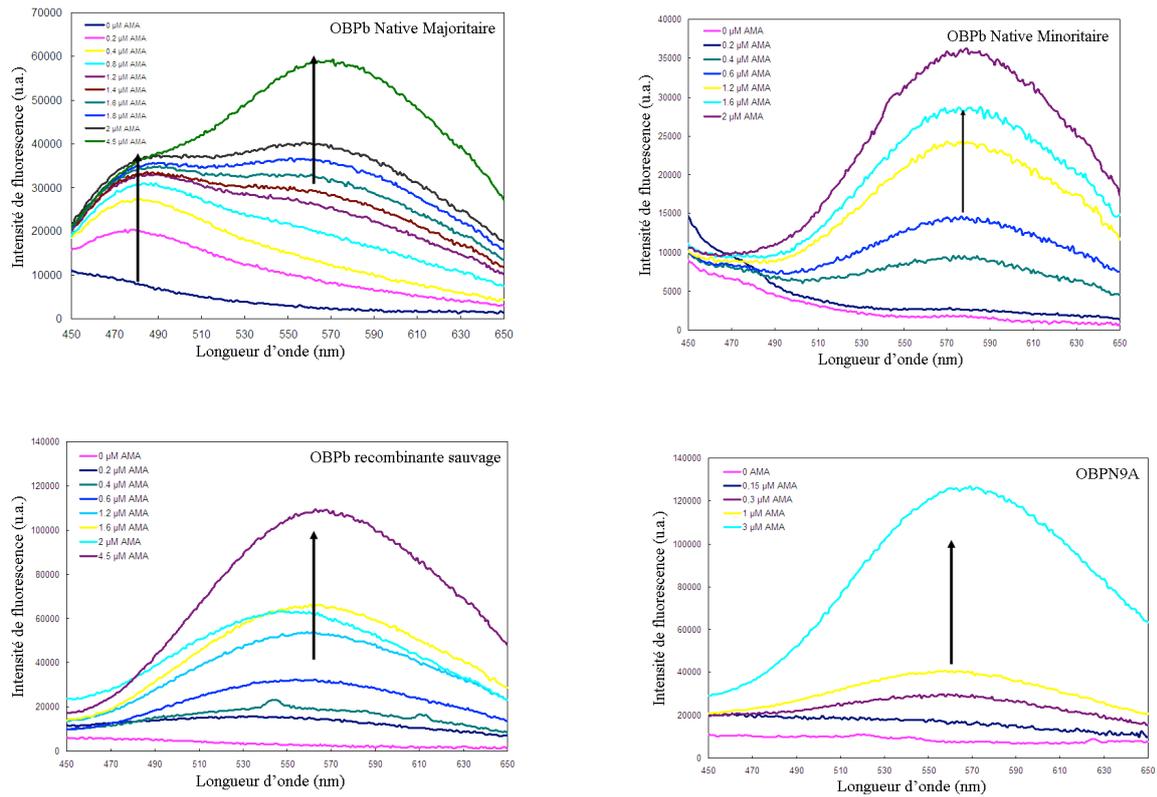


Figure C-16 - Fixation de l'AMA sur les OBP bovines natives et recombinantes (sauvage et mutée). Spectres d'émission de fluorescence des différentes protéines à la concentration de 0,6 μM dans du tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 pour une excitation à 380 nm et des concentrations croissantes d'AMA (de 0 à 4,5 μM).

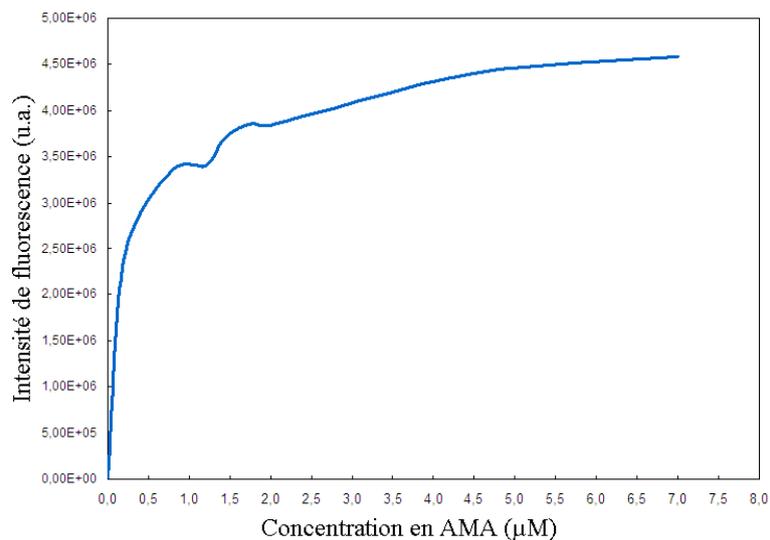


Figure C-17 - Courbe de titration de l'AMA pour l'OBP bovine native majoritaire résultant de la mesure de l'intensité de fluorescence de l'AMA (480 nm) en fonction de sa concentration pour une excitation à 295 nm. a.u. = unité arbitraire.

tampon. L'OBPb est décrite sous l'état d'un homodimère dans les conditions utilisées dans ce travail (cf. Chapitre B). La concentration protéique de la solution de dimère d'OBPb native majoritaire étant de 0,8 μM , cette saturation confirme la liaison d'une molécule d'AMA pour chacun des deux sites de liaison de l'OBPb (stoechiométrie 2:2) (Ramoni *et al.*, 2001).

La fluorescence à 566 nm est observable pour les OBPb recombinantes dès les premiers ajouts d'AMA dans la solution protéique. De plus, l'absence concomitante d'une bande de fluorescence à 480 nm confirme l'absence de fixation de l'AMA dans les OBP recombinantes (Figure C-17). L'OBP native minoritaire, ainsi que les deux OBPb recombinantes (sauvage et mutée) ne fixent pas l'AMA. La courbe de titration de l'AMA pour l'OBPb native majoritaire (figure C-17) a été réalisée à partir de l'aire des bandes de fluorescence à 480 nm (AMA + OBPb, λ_{ex} 295 nm) pour des concentrations croissantes d'AMA, après décomposition spectrale. Cette courbe présente un profil asymptotique avec un début de saturation. Une constante de dissociation du complexe OBPb-AMA a pu être estimée à l'aide de l'équation suivante :

$$y = B_{\text{max}} \times ([\text{AMA}] / Kd + [\text{AMA}])$$

dans laquelle [AMA] correspond à la concentration d'AMA, y à la liaison spécifique à la protéine mesurée par l'intensité de fluorescence de la bande à 480 nm (aire de la bande après décomposition spectrale), B_{max} à la quantité maximum de complexe AMA-OBP formé à saturation. Le Kd estimé est de $0,21 \pm 0,04 \mu\text{M}$. Cette valeur est similaire à celle décrite dans la littérature (Mazzini *et al.*, 2007).

C-III-2 - Déplacement de sondes fluorescentes

Les déplacements de la sonde AMA ont été réalisés avec le ligand naturel de l'OBPb, le 1-octen-3-ol racémique (1-octénol, Ramoni *et al.*, 2001), et avec un composé ne se liant pas à la protéine, le 4-méthyl phénol (Tegoni *et al.*, 2000). L'affinité de ces deux ligands pour l'OBPb majoritaire est mesurée en chassant l'AMA, lié à des concentrations saturantes, par ajout de ligands en concentration croissante. La décroissance de fluorescence de l'AMA lié à la protéine a été mesurée à 480 nm en fonction des différentes concentrations d'1-octénol (Figure C-18).

Comme le montre la figure C-18A, après l'ajout d'une quantité croissante d'1-octénol, on observe une diminution régulière de la fluorescence mesurée à 480 nm, fluorescence correspondant à l'AMA lié à la protéine. Cependant, la courbe de compétition entre 1-octénol

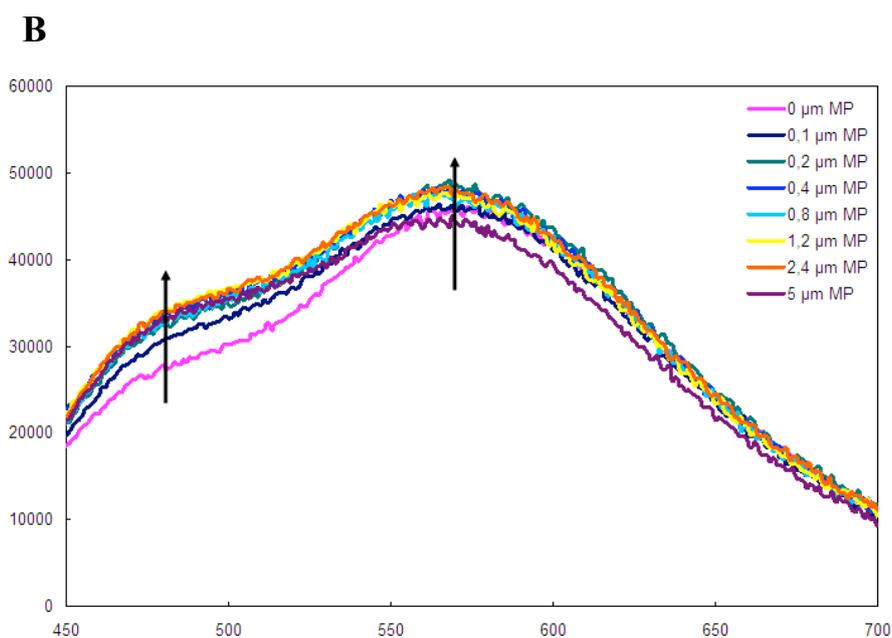
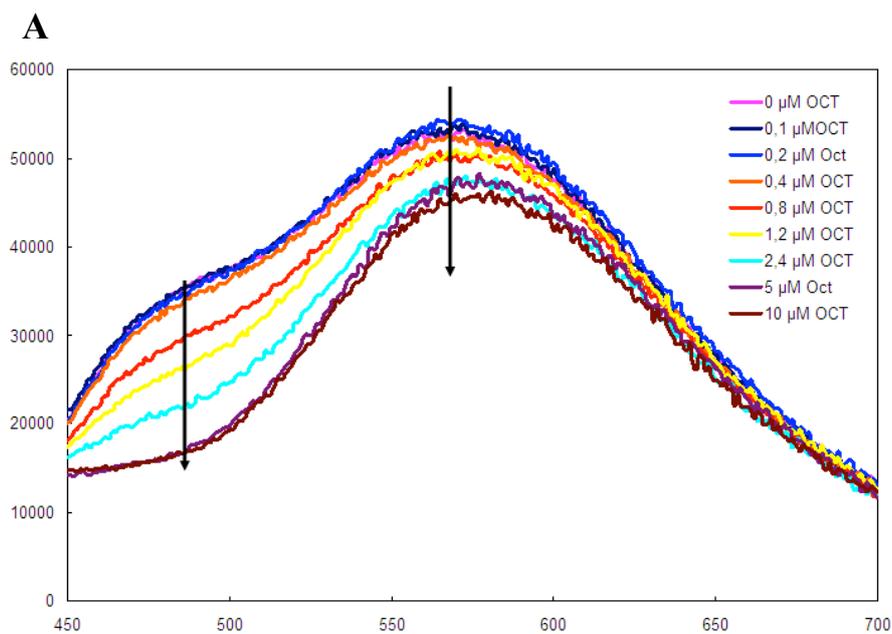


Figure C-18 - Déplacement de l'AMA par l'1-octénol et le 4-méthyl phénol – Spectres d'émission de fluorescence de l'OBP bovine native majoritaire à une concentration de 0,6 μM en présence d'une concentration saturante d'AMA, soit 1,2 μM , pour une excitation à 380 nm et des concentrations croissantes d'1-octen-3-ol (OCT) (A) ou de 4-méthyl phénol (MP) (B). Les flèches indiquent la fluorescence observée à 480 nm (AMA lié à la protéine) et à 560 nm (AMA libre dans le tampon).

et AMA (Figure C-19) ne permet pas de calculer une constante de dissociation OBPb/1-octénol. La diminution de fluorescence n'est pas suffisante pour permettre le calcul de l'IC50. De plus, cette diminution de fluorescence ne suit pas une courbe asymptotique classique mais une droite. Ceci suggère que nous sommes juste dans le début de déplacement de la sonde par l'1-octénol. Pour obtenir une courbe complète, il aurait fallu utiliser des concentrations de ligands supérieures. Pour 0,6 μM de dimère d'OBP saturé avec 1,2 μM d'AMA, une concentration de 10 μM d'1-octénol (soit 10 fois supérieure à celle de l'AMA saturant), le déplacement de l'AMA n'est pas suffisant pour observer une diminution de fluorescence permettant une mesure de l'IC50. L'1-octénol, ligand naturel de la protéine montre donc une affinité pour l'OBPb inférieure à celle de la sonde fluorescence utilisée. Ceci confirme les résultats obtenus par Ramoni et collaborateurs (Ramoni *et al.*, 2001).

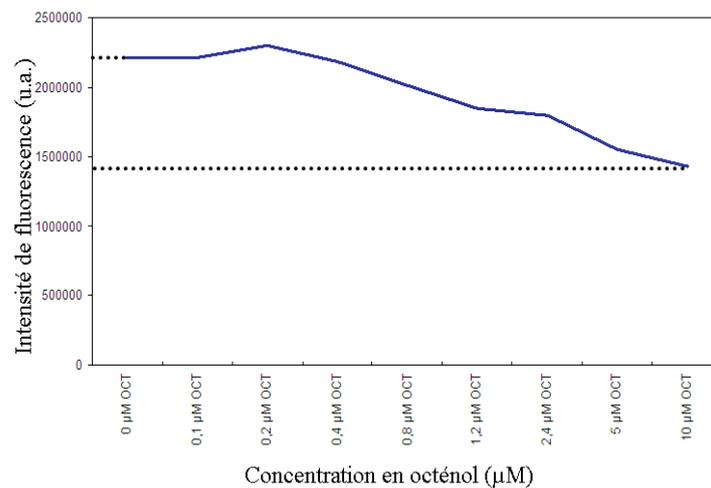


Figure C-19 - Courbe de compétition entre l'1-octénol et l'AMA lié à la protéine. Cette courbe est obtenue après normalisation et décomposition des spectres de fluorescence à 295 nm. L'intensité de fluorescence à 480 nm (spécifique du complexe AMA-OBPb) reportée correspond à l'aire de la bande à 480 nm.

Par ailleurs, l'ajout de 4-méthyl phénol en quantité croissante n'entraîne que de légères variations de fluorescence à 480 nm (Figure C-18B). Il semblerait qu'il n'y ait pas de compétition entre l'AMA lié et le 4-méthyl phénol, confirmant qu'il n'est pas un bon ligand pour l'OBPb (Ramoni *et al.*, 2001 ; Tegoni *et al.*, 2000).

I - Production des OBP bovines recombinantes

L'objectif final de ce travail de thèse était la mise au point un biosenseur utilisant les propriétés d'interaction entre les OBP et leurs ligands odorants, plus particulièrement les odeurs identifiées comme marqueurs de l'oestrus. L'étude des interactions entre des protéines et des ligands potentiels nécessite une quantité relativement importante de protéine. La production en système *P. pastoris* permet d'obtenir des rendements de production compatibles avec ces études (plusieurs mg par litre). De plus, la levure *P. pastoris* est un eucaryote dont les voies de biosynthèse des protéines effectuent les modifications post-traductionnelles que les procaryotes bactériens (*E. coli*) sont incapables de faire, en particulier les glycosylations. Utilisé en routine et avec succès au laboratoire pour la production des OBP porcines (Guiraudie *et al.*, 2005b ; Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009), ce système a été utilisé pour la production des OBP bovines.

La production de l'OBPb sauvage recombinante n'a pas posé de réel problème hormis la présence de plusieurs isoformes, probablement diversement glycosylées, de la protéine. En effet, au lieu de greffer des chaînes glycaniques complexes (comprenant glucose, fructose, etc...) comme les cellules d'Eucaryotes supérieurs, les cellules de levure ne peuvent qu'élonguer ces chaînes avec des mannoses. Cependant, parmi toutes les levures utilisées pour la production de protéines recombinantes mammaliennes, *P. pastoris* est celle qui ajoute le plus petit nombre de mannoses (au maximum 12 au lieu de 40), particulièrement la souche GS115 de *P. pastoris* que nous avons utilisée (Blanchard *et al.*, 2008). Donc il semblerait que l'OBPb sauvage produite par *P. pastoris* ne porte pas les mêmes glycosylations que les protéines natives obtenues après purification par HPLC.

La production de protéine mutée recombinante, OBPbN9A, s'est avérée délicate. En effet, dès les premiers criblages des clones, la quantité de protéine dans le surnageant de culture est très faible. Il n'a pas été possible de la produire dans des cultures de 200 ml. Ce genre de difficulté a déjà été rencontré au laboratoire pour la VEG porcine (P. Nagnan-Le Meillour, communication personnelle). La protéine est visible dans les surnageants de petites cultures de 2 ml, mais n'est pas produite en culture de 200 ml. La seule différence entre ces deux méthodes de production est que dans le premier cas, les protéines recombinantes

résultent d'une expression constitutive. Leur ADN codant est intégré au génome, et elles sont produites en phase de croissance de la cellule de levure. Dans le deuxième cas, leur expression est « forcée » par l'induction avec le méthanol du promoteur AOX situé en aval de leur séquence codante. Cette expression forcée d'une protéine toxique pour la cellule peut avoir pour conséquence un arrêt de la synthèse, ce qui explique que l'OBPN9A apparaisse en début de production, puis disparaisse quand sa toxicité agit sur la cellule. Dans un tel cas, la mise au point de la production de protéine peut prendre plusieurs mois, car des ajustements de nutriments, de pH sont nécessaires, ce qui n'a pu être réalisé dans le temps imparti à cette thèse. Une deuxième hypothèse peut expliquer que la protéine mutée ne s'exprime pas autant que la protéine sauvage. La stabilité d'une protéine résulte d'une sélection d'acides aminés au cours de l'évolution moléculaire, conduisant à la forme la plus stable d'un point de vue thermodynamique. La mutation sur l'Asn9 a peut-être pour conséquence de déstabiliser la protéine, qui est donc faiblement produite, puis éliminée par la cellule.

II - Propriétés de liaison des différentes isoformes de l'OBP bovine

II-1 - Isoformes natives, purifiées à partir des tissus

Les propriétés de liaison de l'OBP bovine native **majoritaire** obtenues lors de nos études de fluorescence correspondent à celles décrites classiquement dans la littérature. Des valeurs de K_d de l'AMA pour l'OBPb native allant de $0,23 \mu\text{M}$ à $1 \mu\text{M}$ ont été répertoriées (Mazzini *et al.*, 2007, Ramoni *et al.*, 2001 ; Vincent *et al.*, 2004). Dans nos conditions expérimentales, un K_d de $0,21 \pm 0,04 \mu\text{M}$ a pu être calculé. Ce K_d est égal à celui du dimère de l'OBPb native à pH 7,8 calculé par Mazzini et collaborateurs (Mazzini *et al.*, 2007). Ce premier résultat laisse supposer que l'ensemble des étapes de purification des OBPb à partir des tissus préserve l'intégrité de la protéine et que nous sommes bien en présence d'un dimère fonctionnel de l'OBPb majoritaire native. Une molécule d'AMA est fixée dans chacune des deux cavités du dimère (stoechiométrie 1 :1) d'OBP, tout comme Ramoni et ses collaborateurs ont pu l'observer (Ramoni *et al.*, 2001). De plus, l'AMA semble présenter une affinité plus importante pour l'OBPb que son ligand naturel, l'octénol, confirmant une fois de plus les résultats obtenus par Ramoni *et al.* (2001).

L'OBPb native fut identifiée à l'origine par sa capacité à lier l'IBMP (Pelosi *et al.*, 1982 ; Bignetti *et al.*, 1985) et est habituellement purifiée en fonction de sa capacité à lier, soit l'IBMP, soit l'AMA (Paolini *et al.*, 1999 ; Mazzini *et al.*, 2002 ; Ramoni *et al.*, 2001). Lors de la purification de l'OBPb à partir de muqueuse respiratoire sur colonne DEAE-cellulose, Pevsner et collaborateurs (1986) obtiennent deux pics protéiques dont l'un est élué à

une DO de 330 nm (Pevsner *et al.*, 1986). Dans ce pic relativement large, seule une faible proportion de protéine lie l'IBMP. C'est cette fraction qui est retenue pour l'ensemble des expérimentations suivantes, en particulier la spectroscopie de fluorescence. Encore aujourd'hui, la caractérisation des OBPb natives se fait en dernière étape de purification par un test de liaison à l'IBMP ou à l'AMA par la plupart des auteurs. L'absence de liaison de l'AMA pour la forme **minoritaire** de l'OBPb purifiée à partir des muqueuses respiratoires de mâle peut expliquer pourquoi cette isoforme n'a pas été décrite jusqu'à présent dans la littérature. La cartographie peptidique, ainsi que les immunodétections utilisant l'anticorps dirigé contre l'OBPb, ne laissent aucun doute sur la nature de la protéine (cf. Chapitre B). Les modifications post-traductionnelles présentes sur ce variant minoritaire (phosphorylations, glycosylations) confèreraient des propriétés de liaison particulières à cette protéine. Cependant, bien que le mode de purification de l'OBPb minoritaire ait été le même que celui de l'OBPb majoritaire, on ne peut exclure une altération de la conformation quaternaire et l'absence de dimérisation de la protéine. Toutefois, le monomère de l'OBP majoritaire, obtenu après traitement à pH acide (2,5) conserve sa capacité à lier l'AMA (Mazzini *et al.*, 2007).

II-2 - Isoformes recombinantes, produites par la levure *P. pastoris*

Aucune des deux OBPb recombinantes (sauvage et mutée) n'a montré de capacité à fixer l'AMA. Jusqu'à présent, les OBPb recombinantes, sauvages dimérisées et mutées de façon obtenir uniquement un monomère de l'OBPb, ont toutes conservé leur capacité à lier l'AMA (Ramoni *et al.*, 2002 ; Ramoni *et al.*, 2008). La présence de modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation de l'OBPb sauvage pourrait expliquer cette absence de fixation de l'AMA tout comme ce qui a été observé pour l'OBPb native minoritaire. En effet, les connaissances actuelles en Glycobiologie permettent de dire que la présence d'une chaîne glycanique n'est pas sans effet sur la fonction des protéines. Ainsi, la présence d'un seul résidu de *O*-N-acétyl-glucosamine sur la VEG porcine modifie ses capacités de liaison et lui confère une spécificité pour les stéroïdes (Le Danvic *et al.*, 2009). Si les glycosylations sont, non seulement un mode de régulation des propriétés de liaison des OBP, mais aussi un moyen de stabiliser le "domain swapping" pour l'OBPb, l'absence de chaîne, aussi bien que la présence d'une chaîne hétérologue (polymannosidique) peuvent avoir comme conséquence d'empêcher la protéine de se conformer, ou de se dimériser. Le mutant OBPbN9A a présenté au cours de sa production un profil d'expression inattendu pour une

OBP: faible expression lors du criblage des clones, difficultés de production en grand volume, migration anormale sur gel d'électrophorèse en condition dénaturante. Il est donc nécessaire de tester à nouveau sa production. L'ensemble des résultats obtenus pour ces deux variants par spectroscopie de fluorescence restent à confirmer, notamment après vérification de leur conformation (dimérique ou non) par gel filtration et par vérification de leur structure secondaire par dichroïsme circulaire.

III - Conclusion

Les études préliminaires effectuées par résonance plasmonique de surface avec les variants de l'OBP porcine ont permis d'invalider cette technique pour l'étude des interactions OBP/ligands. En revanche, la spectroscopie de fluorescence se confirme comme la méthode de choix pour l'étude de ces interactions. Si l'importance de la nature de la chaîne glycanique dans la fonction de liaison de l'OBPb était confirmée, il faudrait envisager un système de production hétérologue compatible avec l'élongation de chaînes de type "mammifères". Les lignées cellulaires mammifères, telles la lignée CHO (Chinese Hamster Ovaries), seront testées à l'avenir pour leur capacité à greffer de telles chaînes lors de la biosynthèse des protéines. L'un des inconvénients est leur faible sécrétion de protéine, mais lors de nos mises au point, nous avons pu diminuer la quantité de protéines nécessaires (de 5 fois) pour la spectroscopie de fluorescence grâce à l'utilisation de mini-cuves à miroir.

Enfin, l'utilisation du dispositif de films LB, mis au point par Hou *et al.* (2005) pour la constitution de biosenseurs capables de détecter les odeurs d'oestrus, n'est pas remise en cause par nos résultats. Cependant par rapport à ces travaux, nous pouvons supposer que l'utilisation d'isoformes d'OBP, à propriétés de liaison spécifiques et bien caractérisées, permettrait d'augmenter considérablement la sensibilité de détection d'un tel dispositif en augmentant sa spécificité. A l'avenir, un autre type de fixation devra être envisagé dans le cadre de la mise au point de biosensor utilisant l'OBP bovine.

Discussion Générale
Perspectives

Le projet PHEROESTRUS et les objectifs de la thèse

L'amélioration de la détection de l'œstrus dans les systèmes d'élevage est une étape clé pour l'amélioration des rendements de production. Jusqu'à ce jour, les méthodes employées restent lourdes à mettre en place et bien souvent coûteuses, ceci allant croissant avec l'expansion des cheptels. Le projet **PHEROESTRUS** vise au renouvellement de ces techniques de détection *via* une approche originale et tout à fait novatrice. Le mâle mammifère est capable de détecter la femelle en chaleurs et ainsi le moment propice pour un accouplement en vue de la reproduction, sur la base d'échanges de signaux chimiques. La connaissance des partenaires impliqués dans ce processus de communication chimique ainsi que leur mode d'interaction devrait à plus long terme permettre le développement de biosenseurs sur le modèle « des nez artificiels ». La **mise au point de tels biosenseurs** suppose une connaissance fine des mécanismes de base de l'olfaction et notamment des modalités de la reconnaissance des médiateurs chimiques par leur protéine de liaison. Le postulat de départ du projet PHEROESTRUS orientait les travaux selon deux axes principaux : 1) l'identification des signaux chimiques émis par les femelles en chaleurs, et 2) l'identification de protéines de liaison de ces signaux soit dans les fluides émetteurs (en l'occurrence l'urine) soit au niveau de la zone olfactive (mucus nasaux, muqueuse respiratoire, VNO). Ces deux axes menés de front devaient permettre de mettre en évidence un ou plusieurs couples potentiels "médiateur chimique/protéine".

Les médiateurs chimiques marqueurs de l'œstrus chez les bovins d'élevage

L'identification de médiateurs chimiques potentiels impliqués dans la reconnaissance de la femelle en chaleurs a donc été entreprise dans les urines de femelle. Ce fluide biologique a été décrit comme un bon vecteur d'information entre le mâle et la femelle au cours des chaleurs chez les bovins (Dehnhard & Claus, 1988 ; Rameskumar *et al.*, 2008). Notre stratégie basée sur l'étude des urines de façon individuelle au sein d'un groupe d'animaux a mis en évidence l'existence d'une grande hétérogénéité dans les composés présentant des variations au cours du cycle. Toutefois, plusieurs molécules ont pu être identifiées comme marqueurs potentiels de l'œstrus dans les urines de vache : le **γ -chromène**, le **coumarin**, le **6-amino-undécane**, le **DMSO₂**, le **squalène**. Tous ces composés sont référencés comme molécules impliquées dans la communication chimique dans le monde animal. Leur

présentation à des taureaux (naïfs ou pas) devrait permettre de valider leur potentielle activité biologique. Les analyses des mucus vaginaux, uniquement émis au moment de l'œstrus a montré, contrairement aux urines, une composition chimique homogène entre les animaux et stable au cours des différentes collectes (collectes « Châteauvillain »). L'analyse plus approfondie de ce fluide sera essentielle lors d'études ultérieures, d'autant plus qu'il est décrit comme inducteur du comportement sexuel des mâles (Klemm *et al.*, 1987). De plus, les signaux perçus par le mâle dans les urines de femelle pourraient provenir des mucus vaginaux au cours de la miction (lavage de la zone péri-vaginale). A l'avenir, l'étude approfondie de ce fluide est à envisager, tant au niveau de sa composition chimique (en tant que fluide émetteur de médiateur chimique) mais aussi pour sa composition peptidique. En effet, au cours de ces travaux, l'étude des protéines du mucus vaginal n'a pas été effectuée, alors que chez le Hamster une protéine de ce fluide, l'aphrodisine, est porteuse du signal sexuel femelle (Singer *et al.*, 1986 ; Briand *et al.* 2004).

Les marqueurs de l'œstrus sont-ils des phéromones?

Au cours de nos travaux, nous nous sommes focalisés sur les composés volatils attirant le mâle à distance et suscitant son intérêt et l'investigation de la femelle. Nous sommes partis de l'hypothèse de départ que ces signaux chimiques pouvaient être des phéromones sur les critères suivants:

- mélange de plusieurs molécules de composition stable entre individus,
- implication dans le comportement reproducteur,
- émission spécifique au moment de l'œstrus,
- mélange dont la perception par le mâle induit une séquence comportementale innée.

Dans une espèce donnée, l'existence et la stabilité de la composition phéromonale sont le fruit d'une pression de sélection importante puisque la phéromone assure le maintien de la barrière interspécifique. En l'absence de toute pression de sélection sur le système reproducteur, comme c'est le cas en élevage, la persistance de tels signaux chimiques peut prendre un **caractère aléatoire**. Il a d'ailleurs été démontré que les conditions d'élevage intensif modifiaient la mise en place des comportements normaux connus chez les espèces sauvages suite au stress induit (Mormède, 1995). Ceci permettrait d'expliquer l'hétérogénéité des signaux que nous avons identifiés au cours des différentes collectes, et au-delà, pourquoi l'œstrus est si difficile à détecter chez les bovins. Les études comportementales menées dans les années 80 et 90 montrant l'implication de signaux chimiques dans les fluides biologiques de la vache en œstrus n'ont pas été réitérées depuis. Des tests préliminaires effectués dans le

cadre du projet Pheroestrus par C. Briant et ses collaborateurs (INRA, Nouzilly), n'ont pas permis de mettre en évidence de réelle discrimination entre les urines prélevées à différents stades du cycle oestral présentés par les taureaux. Les marqueurs potentiels de l'oestrus identifiés dans ce travail ne remplissent pas les critères permettant de définir une phéromone. Ils n'en sont pas moins pertinents pour la mise au point d'un biosenseur, à la condition d'approfondir les études et de déterminer par des tests comportementaux leur activité sur les mâles.

Les protéines de liaison

Deux protéines se révèlent de bonnes candidates pour la mise au point d'un biosenseur détecteur des marqueurs de l'oestrus, l'une dans l'urine, fluide émetteur, **l'albumine**, l'autre dans les tissus olfactifs détecteurs, **l'OBPb**. L'analyse de leurs ligands naturels a montré qu'elles contiennent les mêmes composés, **l'oléanitrile**, un **méthyl ester d'acide octadécénoïque** et du **(Z)-9-octadécénamide**. Ce résultat est tout à fait remarquable, même si ces composés diffèrent de ceux identifiés à partir des urines. Ils constituent une nouvelle piste pour la recherche de ces composés dans les fluides émetteurs. L'acide 9-octadécénoïque est d'ailleurs retrouvé de façon systématique dans les urines que nous avons analysées, sans toutefois de variation significative au cours du cycle oestral. La présence de son méthyl ester lié à la fois à l'OBPb des mucus nasaux et à l'albumine urinaire reste à expliquer, et des tests comportementaux pourraient valider son éventuelle activité biologique. Enfin, il semble que l'OBP porcine des urines, en plus grande quantité au stade pré-oestrus pourrait jouer un rôle important dans la liaison avec des marqueurs de l'oestrus, et l'étude approfondie de ses interactions avec des signaux chimiques pourrait s'avérer très informative pour la mise au point d'un biosenseur. En effet, si les marqueurs de l'oestrus ne sont pas des phéromones, on peut envisager de les détecter avec une protéine hétérospécifique, à la condition que ses propriétés de liaison soient adéquates, ce que la spectroscopie de fluorescence pourra déterminer.

Microdiversité de l'OBPb

Ce travail a permis de mettre en évidence, pour la première fois, l'existence de variants de l'OBPb dans les tissus olfactifs des mâles et des femelles. En premier lieu, l'existence de **deux variants génétiques** semble possible. Dans la banque de données GenBank, deux séquences différentes de l'OBPb sont déposées : celle de l'OBPb cristallisée (n° d'accèsion P07435.2 ; Tirindelli *et al.*, 1989) et une autre séquence déduite d'ARN messager

(n° d'accèsion NW_001502810.1). Ces deux séquences protéiques ne diffèrent que par trois acides aminés en positions 16, 112 et 117. Pour le résidu en position 16, la présence d'une proline a pu être démontrée sur les OBPs des tissus femelle par cartographie peptidique. En revanche, chez le mâle, aucun peptide N-terminal correspondant à cette séquence n'a été retrouvé, mais le séquençage des transcrits codant l'OBPb dans les tissus olfactifs et dans le foie mâle indique la présence d'une sérine en position 16. Ces premiers résultats semblent suggérer l'existence d'une différence de séquence de l'OBPb chez le mâle et chez la femelle dans la partie N-terminale. Le séquençage des transcrits codant l'OBPb des tissus femelles devrait permettre de confirmer ce point. Les autres acides aminés (112 et 117) divergeant entre les séquences d'OBPb sont situés sur des peptides que nous n'avons pas retrouvés systématiquement lors des analyses par cartographie peptidique. Lorsque le peptide est présent, le résidu en position 112 était une thréonine et celui en position 117 du glutamate. Chez la souris, la microdiversité des MUP provient de l'expression de nombreux variants génétiques, ne se distinguant que par quelques modifications dans la chaîne peptidique, mais conférant aux individus qui les portent une "signature" individuelle (Sharrow *et al.*, 2002). Ces modifications interviennent au niveau de la poche de liaison et semblent moduler la libération de ligands (Beynon *et al.*, 2002). Ici, le peptide N-terminal contenant l'acide aminé 16 se situe sur une partie flexible de la protéine située à l'arrière de la poche de liaison, sans contact apparent avec le ligand (Bianchet *et al.*, 1996). Les résidus 112 et 117 se situent au niveau de l'extrémité C-terminale, également flexible et impliquée dans la mise en place du « domain swapping » permettant la dimérisation de l'OBPb. Ces deux résidus ne semblent toutefois pas impliqués dans le mécanisme de « domaine swapping » en lui-même (Bianchet *et al.*, 1996, Tegoni *et al.*, 1996).

En second lieu, nous avons montré que différentes isoformes de l'OBPb proviennent de l'ajout de **modifications post-traductionnelles (MPT)**, selon des modalités qu'il reste à préciser. Les études immunochimiques réalisées sur des extraits protéiques totaux ont permis de montrer la présence de **phosphorylations** et de **glycosylations** : **O-GlcNac** et **N-glycosylation** sur les OBPb des mucus nasaux et des muqueuses respiratoires bovins. La purification à partir des tissus des différentes isoformes étant possible par HPLC, l'étude des différents variants purifiés va être entreprise de façon à pouvoir les caractériser individuellement. L'étude des MPT (poursuite de la localisation des phosphorylations et de la O-GlcNac, identification de la chaîne N-glycannique) sur les OBPb natives purifiées et sur leurs homologues recombinantes devrait nous permettre de poursuivre notre travail sur les spécificités d'interaction OBPb-ligands par spectroscopie de fluorescence, avec un intérêt

particulier pour les marqueurs potentiels de l'oestrus identifiés dans les urines, le mucus et les protéines de liaison. La spectroscopie de fluorescence s'est révélée un outil de choix pour l'étude de ces interactions. Elle est maintenant utilisée en routine au laboratoire et nécessite de moins en moins de protéine grâce à l'utilisation de cuves à miroirs. L'analyse des propriétés de liaison des variants purifiés est désormais possible, et permet de s'affranchir de l'utilisation de protéines recombinantes. Après détermination des propriétés de liaison des couples spécifiques protéine/ligand, le système utilisé par Hou et collaborateurs (Hou *et al.*, 2005) pourra être envisagé dans la perspectives d'études commerciales, car il conserve les propriétés de liaison de la protéine greffée, au contraire du système RPS, qui s'est révélé complètement inadapté à l'étude de nos protéines.

Perspectives générales

Même si à l'issue des travaux menés au cours de cette thèse, aucune certitude quant à l'identification de partenaires protéines de liaison/marqueurs impliqués dans la détection de l'oestrus chez la vache ne peut être avancée, les résultats obtenus ouvrent de nombreuses perspectives d'études. Tout d'abord une réorientation de l'identification de médiateurs chimiques et de protéines dans le mucus vaginal de vaches est nécessaire. La mise en évidence de la microdiversité de l'OBPb suggère un rôle actif des OBPb dans la reconnaissance des molécules odorantes, contrairement au rôle de transporteur passif qui lui est traditionnellement attribué. Les études d'affinités de liaison pour différents ligands des variants purifiés devraient permettre de déterminer l'influence des modifications post-traductionnelles. Enfin, si la N-glycosylation est une modification post-traductionnelle typique des protéines sécrétées, la phosphorylation et la O-N-acétylglucosaminylation sont décrites comme intracellulaires. La présence de telles MPT, spécifiques du compartiment intracellulaire, sur l'OBPb, protéine extracellulaire, est fondamentalement intéressante et permet d'envisager la mise en évidence de nouvelles voies de biosynthèse des enzymes impliquées dans les mécanismes de phosphorylation et de O-N-acétylglucosaminylation.

Matériels et Méthodes

I - Echantillons biologiques

I-1 - Collecte des échantillons biologiques chez l'animal émetteur (urines et mucus vaginaux)

Afin de mettre en évidence les composés chimiques impliqués dans la détection de l'oestrus par le mâle chez les bovins, plusieurs collectes d'urine et de mucus cervicaux ont été réalisées sur des vaches ou des génisses dans les stations expérimentales de Nouzilly (INRA, Tours) et de Châteauvillain (UNCEIA).

I-1-1- Collectes réalisées sur des vaches réformées de race Prim'holstein (Nouzilly, INRA de Tours)

Deux séries de collectes ont été réalisées à la station expérimentale de Nouzilly (INRA, Tours) en 2006 sur des vaches de réforme de race Prim'Holstein. Deux protocoles de collecte différents ont été suivis. Lors de la première série de collecte, effectuée par les animaliers de la station expérimentale de Nouzilly, l'urine a été prélevée à l'aide d'un cathéter directement dans la vessie de l'animal au cours d'un cycle naturel à raison de trois collectes par cycle. Chaque collecte caractérise un stade précis du cycle : l'oestrus (J0), la phase lutéale (J+7) et la fin du cycle (J+18) correspondant à la phase folliculaire pré-ovulatoire (ou pré-oestrus). La seconde série de collecte a été réalisée par Sumant Vyas (Post-doctorant, INRA) sur des animaux synchronisés par traitement à la prostaglandine (PGF2 α). L'urine a été collectée au moment des mictions naturelles à trois stades du cycle en pré-oestrus (J+1 post-PGF2 α), en oestrus (J+2 post-PGF2 α) et en phase lutéale (J+7 post-PGF2 α). Le suivi des cycles au cours de ces collectes a été réalisé par observations journalières des animaux associées à un dosage de la progestérone plasmatique.

I-1-2 - Collectes réalisées sur des vaches du programme GENANIMAL (Châteauvillain, UNCEIA)

Trois sessions de collectes (mai 2007, octobre 2007 et mars 2008) ont été réalisées à la station expérimentale de Châteauvillain de l'UNCEIA sur 6 à 8 vaches (races Holstein et Montbéliarde) du programme GENANIMAL. Toutes les vaches collectées ont été synchronisées dans leur cycle par deux injections de Prostaglandine (PGF2 α) à 10 jours d'intervalle, avec une seconde injection réalisée le jour des premières collectes (J0). Les

	Vache 0630	Vache 0631	Vache 0832	Vache 4164	Vache 6105	Vache 9351	Vache 5644	Vache 5260	Vache 6262	Vache 4248
	H	H	H	H	H	H	H	M	M	M
« Chateauvillain 1 » Mai 2007 P4, LH (2/j)		*				*	*	*	*	*
							Implant	Implant	Implant	
« Chateauvillain 2 » Octobre 2007 P4, LH (4/j), E2 (4/j)	*	*	*				*	*		*
			PGF2α							
« Chateauvillain 3 » Mai 2008 P4, LH (4/j), E2 (4/j) Echographie	*	*	*	*	*		*	*		*

Tableau M-1 - Animaux collectés à la station expérimentale de Chateauvillain entre mai 2007 et avril 2008. Le sigle (*) indique les vaches collectées. La race de l'animal est indiquée par les lettres H et M, respectivement pour les animaux Prim'holstein et Montbéliarde. La collecte ayant été réalisée sur les vaches superovulées est indiquée par les cases grisées. « Implant » et « ~~PGF2 α~~ » désignent respectivement les animaux ayant subi un traitement FSH et ceux n'ayant eu qu'une seule injection de PGF2 α . P4 = progestérone, LH = hormone lutéinisante, E2 = oestradiol.

	Stade du cycle		
	Pré-oestrus	Oestrus	Phase lutéale
Vaches suivies au cours de leurs premières chaleurs			
Vache 1935		✓	✓
Vache 2098		✓	✓
Vache 4160	✓	✓	✓
Vache 7835	✓	✓	✓
Vaches suivies au cours de leurs deuxièmes chaleurs			
Vache 1920	✓	✓	✓
Vache 3465	✓	✓	
Vache 4810	✓		
Vache 9052	✓	✓	✓

Tableau M-2 - Collecte des urines de génisses.

Des dosages plasmatiques hormonaux ont été réalisés en complément des observations visuelles et comportementales faites afin de déterminer le moment de l'ovulation. Des prises de sang ont donc été effectuées toutes les 6 heures afin de doser l'hormone lutéinisante (LH) et l'oestradiol (E2) durant la semaine ayant suivi la seconde injection de prostaglandine. Les dosages de progestérone (P4) ont été effectués toutes les 24 heures. Le sérum issu de chaque prise de sang a été stocké à -80°C jusqu'au dosage de la P4 (kit ovucheck plasma, Biovet), de la LH (kit LH DETECT, INRA de Nouzilly) et de l'E2 réalisé au département Recherche et Département de l'UNCEIA par Nadine Jeanguyot (Maisons-Alfort, UNCEIA). Un suivi du développement folliculaire a été réalisé en complément, lors de la collecte de mars 2008 à raison de deux échographies par jour.

Des collectes d'urine ont été réalisées deux à trois fois par jour en fonction des animaux lors de mictions spontanées. Au moment de la collecte, les urines sont fractionnées dans 4 tubes de 4 ml en verre scellés par des bouchons en téflon (Supelco). De plus, deux aliquots de 15 ml sont réalisés (pour analyse des protéines urinaires) dans des flacons en plastique de 15 ml. Les mucus cervicaux, fluides biologiques spécifiques des chaleurs, ont également été collectés dans des flacons de 20 ml en verre fermés par des bouchons en téflon (Supelco). L'ensemble des échantillons a immédiatement été stocké à -80°C après collecte jusqu'à l'analyse au laboratoire de l'UGSF de Lille.

L'ensemble des données relatives aux animaux, ainsi que les traitements subits au cours des différentes sessions de collecte, sont indiqués dans le tableau M-1.

I-1-3 - Collectes réalisées sur des génisses (Nouzilly, INRA de tours)

Une session de collecte a été réalisée sur des génisses de 18 mois, par l'équipe des animaliers de l'Unité Expérimentale de Nouzilly (INRA, Tours) en novembre 2008 au cours de leurs premiers cycles oestriques. Les échantillons urinaires ont été collectés en pré-oestrus (entre J-3 et J-1 avant l'oestrus), en oestrus et en phase lutéale (J+10) au cours de cycles naturels. La détermination des stades a été réalisée par un suivi minutieux des comportements à raison de 5 observations visuelles par jour pendant 15 min depuis avril 2007. Des échographies, à raison de 3 fois par semaine, y sont associées de façon à surveiller la maturation folliculaire. Les échantillons collectés sont conservés à 4°C après collecte avant un stockage dans les 4 heures à -80°C. En fonction des animaux, les urines n'ont pas pu être collectées aux trois stades définis. L'ensemble des prélèvements effectués est synthétisé dans le tableau M-2.

I-2 - Collectes des échantillons biologiques chez l'animal récepteur

La muqueuse respiratoire (respiratory mucosa, RM), l'organe voméronasal (vomeronasal organ, VNO) ainsi que le foie sont prélevés par dissection chirurgicale par Monique Ottogalli (PRC, INRA, Tours) sur deux vaches et un taureau de race Prim'Holstein immédiatement après la mort de l'animal. La moitié du tissu est stockée dans un liquide stabilisateur des ARN (RNAlater, QIAGEN), l'autre moitié est stockée directement dans un tube à fond conique de 14 ml. L'ensemble est congelé à -80°C et envoyé par transporteur dans de la carboglace à l'UGSF, où il est conservé à -80°C jusqu'à l'extraction des protéines ou des ARN.

Des mucus nasaux sont collectés le premier jour des collectes et lors de la « période active » des femelles à l'aide d'une seringue de 25 ml. Les mucus nasaux sont ponctionnés puis transférés dans des tubes en verre de 20 ml (Supelco) fermés par des capuchons en téflon (Supelco).

Le mucus nasal de femelle est directement prélevé à l'aide d'une seringue dans la cavité nasale des vaches dont les urines ont été collectées lors des sessions « Châteauvillain 2 et 3 » (Chapitre A-1-2), et immédiatement conservé à -80°C. Ces collectes sont effectuées le jour de la seconde injection de PGF₂ α (pré-oestrus) et lors des chaleurs actives de l'animal. Le mucus nasal de mâle est collecté de la même façon sur cinq taureaux avant et après qu'ils ont respiré de l'urine de femelle en œstrus (Nouzilly, INRA, Tours).

Les urines de vache utilisées sont celles collectées à la station expérimentale de Châteauvillain (UNCEIA) (cf. chapitre A, paragraphe II).

II - Analyses de la composition chimique des fluides biologiques échantillonnés

Deux méthodes d'extraction des composés chimiques ont été utilisées au cours de nos mises au point méthodologiques :

- la micro-extraction en phase solide (Solid-Phase Micro-Extraction, SPME), qui permet de s'affranchir de tout artéfact chimique dû au solvant

- une extraction à l'aide d'un solvant organique (dichlorométhane (DCM), pentane, hexane) (Sigma-Aldrich).

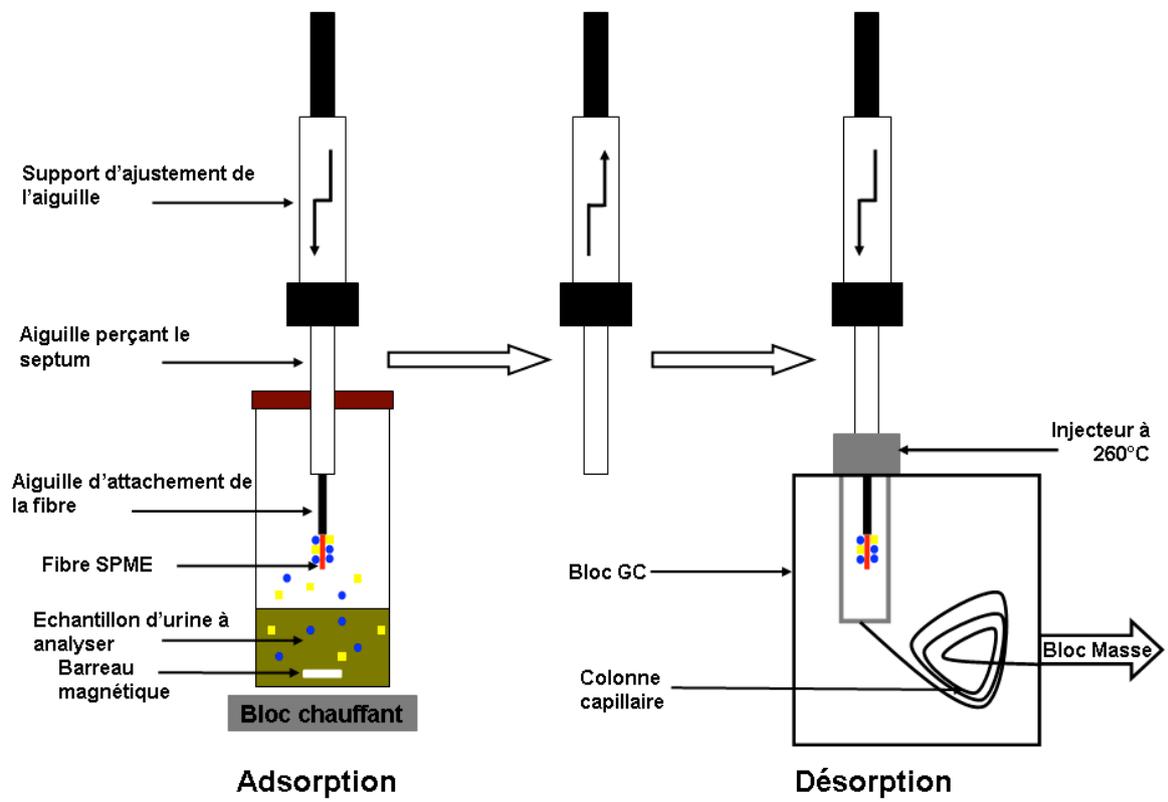


Figure M-1 - Schéma de la technique SPME

II-1 - Extraction par SPME en mode « espace de tête »

La SPME est une technique de concentration ne nécessitant pas de solvant et pour laquelle la préparation de l'échantillon est très souvent limitée à son prélèvement. Le principe de concentration par SPME repose sur l'adsorption de composés chimiques sur une phase polymérique greffée sur une fibre de silice.

En fonction de la tension de vapeur des composés recherchés, l'adsorption sur la fibre SPME peut être conduite soit en mode espace de tête, soit en mode immersion. En mode espace de tête, la fibre adsorbe les analytes d'intérêt dans la phase gazeuse située au dessus de la matrice liquide ou solide. En mode immersion, la fibre est directement plongée dans le fluide biologique. Une fois concentrés sur la fibre SPME, les composés chimiques peuvent être désorbés thermiquement dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse (Figure M-1). Plusieurs types de fibre existent selon la nature de la phase polymérique. Chaque phase présente un spectre d'adsorption plus ou moins large pour une classe de composés donnés.

Au cours de nos expériences, 2 ml d'urine sont décongelés sur glace et mis sous agitation afin d'améliorer l'obtention d'un équilibre entre les composés analysés et la fibre SPME, à une température de 37°C (température corporelle de l'animal, donc à laquelle l'urine a été émise). La fibre est sortie de son aiguille et exposée en mode « espace de tête » durant 30 à 60 min. Elle est ensuite rétractée jusqu'à l'analyse dans les cinq minutes suivantes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Gas Chromatography/ Mass Spectrometry, GC/MS).

II-2 - Extraction par solvant organique

Quatre millilitres d'urine et de mucus cervicaux stockés à -80°C sont décongelés sur glace et extraits volume à volume par un solvant organique. Plusieurs solvants ont été testés (DCM, pentane, hexane) avant de porter notre choix sur le DCM qui présentait une capacité d'extraction d'un plus grand nombre de composés chimiques. Les extractions se font dans des tubes en verre fermés par des bouchons à vis en téflon (Supelco) afin de minimiser les contaminations par des résidus plastiques (les phtalates). Après passage rapide au vortex, les échantillons sédimentent à température ambiante pendant 10 min avant d'être centrifugés à 2500 rpm durant 20 min. À l'issue de cette centrifugation, la phase organique est séchée sur colonne de sulfate de sodium (FLUKA) avant d'être concentrée 100 fois sous flux d'azote et stockée à -20°C jusqu'aux analyses (dans les deux semaines suivant l'extraction).

II-3 - Identification des composés chimiques par GC/MS

Les analyses sont conduites sur un appareil de type FOCUS/DSQII (Thermo Scientific) dédié au projet (co-financement UNCEIA, INRA, CNRS, Haras Nationaux) constitué d'un Focus GC couplé à un spectromètre de masse de type quadrupole (DSQII, Thermo scientific). Au cours des analyses cinq colonnes différentes ont été utilisées pour séparer les composés extraits : une CP-sil5 CB low Bleed/MS 60 m x 0,25 µm ID x 0,25 µm (SUPELCO), une TR-1MS 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm (Thermo), une 1MS-SolGel 30 m x 0,25 µm ID x 0,25 µm (SGE), une TR-1MS 30m x 0,25 ID x 0,25 m (Thermo), une TR-1MS 30m x 0,25 ID x 0,25 m (Thermo) et une Equity 5 30 m x 0,25 µm ID x 0,25 µm (SUPELCO)

Pour une extraction en mode SPME, l'aiguille est introduite directement au travers du septum de l'injecteur, et la fibre est sortie durant 1 min dans l'injecteur à 260°C. L'introduction de la fibre à une température élevée produit une désorption quasi-immédiate de l'échantillon par augmentation des coefficients de diffusion. Pour une extraction réalisée avec des solvants, des aliquots de 2 µl sont injectés en mode splitless (30 sec) dans un injecteur à 260°C.

Le même programme d'analyse est utilisé pour les échantillons extraits par solvant ou par SPME : 30°C pendant 4 min puis 5°C/min jusqu'à 280°C et isotherme à 280°C pendant 10 min. L'ionisation des molécules entrant dans le spectromètre de masse est obtenue par impact électronique à 70 eV avec une température de source de 180°C.

Notre démarche scientifique ne s'appuyant pas sur une identification exhaustive de la composition des urines, nous avons porté notre intérêt sur les molécules variant au cours du cycle œstral de l'animal et plus particulièrement aux moments du pré-œstrus et de l'œstrus. L'identification de ces composés est réalisée par comparaison des spectres chimiques obtenus avec ceux de la banque NIST Search (National Institut Search Technology).

III - Préparation et séparation des protéines

III-1 - Extraction des protéines à partir des tissus et fluides biologiques

Les tissus olfactifs (VNO, MR) ainsi que le foie sont fragmentés sur glace par morceaux de 50 mg. Les mucus nasaux et cervicaux sont aliquotés par fractions de 500 µl sur glace. L'extraction des protéines est ensuite réalisée par partition de phase dans deux volumes d'une solution de chloroforme/méthanol (2 /1, v /v) à 4°C. Après homogénéisation à l'aide d'un

Gel de concentration	Gel de séparation
Acrylamide/bisacrylamide 37,5 :1 4%	Acrylamide/bisacrylamide 37,5 :1 16,8%
50 mM Tris/HCl	300 mM Tris/HCl
10 % (p/v) TEMED	10 % (p/v) TEMED
1,64 mM persulfate d'ammonium	1,64 mM persulfate d'ammonium
pH 6,8	pH 8,8

Tableau M-3 - Composition des gels de polyacrylamide utilisés lors de la séparation des protéines.

piston, l'échantillon est centrifugé à 13000 rpm pendant 15 min à 4°C, ce qui permet l'obtention de deux phases. La phase inférieure (chloroformique) contient les lipides, tandis que la phase supérieure (méthanolique) contient les protéines. La phase supérieure est prélevée, séchée sous vide (Concentrator, Eppendorf) et conservée à -20°C.

Les urines sont dialysées dans des membranes Spectra/Por[®] de seuil de coupure 3 kDa (Spectrum Laboratories, Inc.) dans de grands volumes de tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM pH 8 à 4°C. Les échantillons dialysés sont aliquotés par 1,5 ml, séchés au Speedvac et conservés à -20°C.

III-2 - Dosage des protéines

Les protéines extraites sont dosées à l'aide du kit de dosage protéique « μ BCA Protein Assay Reagent » selon les recommandations du fournisseur (Pierce). Ce dosage colorimétrique est basé sur la formation d'un complexe entre l'acide bicichonique (BCA) et deux liaisons peptidiques en présence de Cu^{2+} en milieu alcalin. Ce complexe montre une absorption à 562 nm qui croît linéairement avec la concentration en protéine. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec la BSA (Bovine Serum Albumine). Vingt microlitres d'échantillons sont ajoutés à 150 μ l du mélange de réactifs A, B et C (50/48/2, v/v/v) du kit « μ BCA Protein Assay » et incubé 2h à 37°C. Les absorbances à 562 nm sont mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaque Power Wavex (Biot-Tek Instruments, Inc.)

III-3 - Séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les extraits protéiques sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, soit en conditions natives, soit en conditions dénaturantes. Le tableau M-3 résume la composition des gels en conditions natives. Un ajout de 0,1% de sodium dodécyl sulfate (SDS) est effectué lors de la préparation de chaque gel lorsque les électrophorèses sont réalisées en conditions dénaturantes.

Quinze microgrammes de protéines extraites sont repris par 15 μ l de tampon d'échantillon « natif » (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, saccharose 20%, solution alcoolique d'amarante à 1,5 %, pH 8) ou « dénaturant » (Tris 62,5 mM pH 6,8, SDS 5%, sucrose 40%, β -mercaptoethanol 20% et une paillette de Bleu de bromophénol) et déposés sur un gel. Les échantillons repris dans le tampon « dénaturant » sont bouillis 5 min à 100°C préalablement au dépôt sur gel. Lors de la migration en conditions dénaturantes, 3 μ l de marqueurs de poids moléculaire (Precision Plus Protein[™] Standards, BioRad) sont déposés en même temps que les échantillons afin d'estimer la taille des protéines.

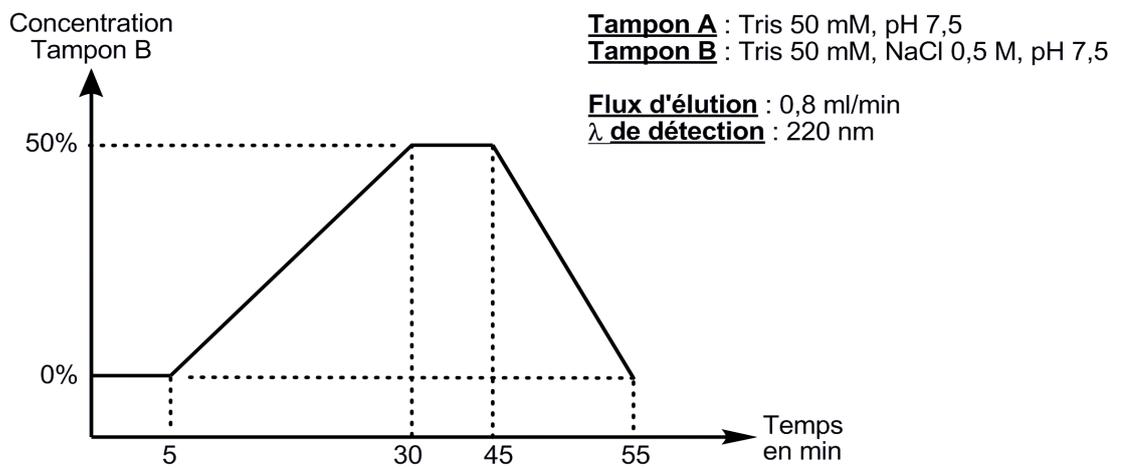


Figure M-2 - Gradient d'éluion utilisé en chromatographie échangeuse d'ions pour la purification des protéines

L'électrophorèse se fait à voltage constant (150 V) durant 90 min dans le tampon de migration (Tris 20 mM, Glycine 192 mM, avec 0,1 % de SDS lors des électrophorèses en conditions dénaturantes). A l'issue de la migration, les protéines sont visualisées par coloration du gel dans une solution de bleu de Coomassie colloïdal (solution mère de bleu (éthanol 95%, Serva Blue R250 700 mg) 5%, acide trichloracétique 12%). Le gel est ensuite décoloré dans de l'eau jusqu'à obtention d'un fond de gel transparent. La sensibilité de cette coloration est inférieure au microgramme.

III-4 - Purification des protéines par chromatographie échangeuse d'anions

La purification des protéines extraites des différents tissus a été réalisée grâce à un système de chromatographie en échange d'ion de type DIONEX équipé d'une colonne PROPAC PA1 4 x 250 (DIONEX) dont la phase hydrophobe est composée de groupes d'amines alkyles quaternaires, spécifiée pour l'analyse et la purification des protéines. Cinquante microgrammes de protéines reprises dans 500 µl de tampon A (Tris 50mM, pH 7,5) sont filtrés par centrifugation (Vivaclear, 0,8 µm, Sartorius) puis injectés sur la colonne et l'élution est réalisée selon le gradient présenté sur la figure M-2. Un lavage de la colonne est effectué systématiquement après chaque purification par 3 volumes de colonne de tampon B et une ré-équilibration de la colonne par 7 volumes de Tampon A. La détection des pics protéiques se fait à une longueur d'onde de 220 nm à l'aide d'un détecteur Spectra 100 (Spectra Physics). L'élimination des sels est réalisée par dialyse de chaque fraction sur membrane SpectraPor[®] de seuil de coupure de 3 kDa (Spectrum Laboratories, Inc.) dans de l'eau MilliQ (Millipore). La présence de protéines est confirmée par une électrophorèse des fractions séchées sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. La nature de la protéine est déterminée par spectrométrie de masse selon le protocole décrit dans le paragraphe IV-1.

IV- Identification des protéines

IV-1 - Cartographie peptidique

IV-1-1 - Réduction - Alkylation

Après électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les bandes d'intérêt sont découpées au scalpel et décolorées par des lavages successifs dans une solution de bicarbonate d'ammonium/acétonitrile (v/v) jusqu'à décoloration complète. Elles sont ensuite déshydratées dans l'acétonitrile pur avant séchage au Speedvac pendant 15 min.

Les bandes sont réhydratées dans une solution de DTT 10 mM dans du bicarbonate d'ammonium 50 mM à 56°C durant 45 min. Les protéines ainsi réduites sont alkylées avec une solution d'iodoacétamide 55 mM pendant 30 min à l'obscurité. Les bandes sont ensuite rincées avec une solution de bicarbonate d'ammonium 50 mM, déshydratées par des rinçages successifs à l'acétonitrile et séchées au Speedvac.

IV-1-2 - Digestion « en gel »

La digestion de protéines est réalisée par la trypsine, une endopeptidase hydrolysant les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (Lysine (Lys) ou Arginine (Arg)) engage sa fonction acide.

Les bandes sont réhydratées avec 5 µl d'une solution de trypsine (Sequencing Grade Modified Trypsin, PROMEGA) à 2 ng/µl pendant 30 min à 4°C. A l'issue de la réhydratation, la bande est recouverte par 100 µl de tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM et incubée à 37°C pendant 15 heures.

IV-1-3 - Extraction des peptides

Les peptides générés lors de la digestion sont extraits par deux bains successifs de 15 min à 30°C dans une solution d'acétonitrile/acide formique (50/10, v/v) suivi d'un bain d'acétonitrile/acide formique (95/5, v/v). Les surnageants de chaque bain d'extraction sont poolés et séchés au Speedvac.

IV-1-4 - Microdessalage sur ZipTipC18

Les sels sont éliminés des échantillons peptidiques par chromatographie en phase inverse sur micro-colonne Zip-Tip C18 (Millipore). Les Zip-Tip sont activés avec une solution de méthanol, puis lavés à l'acide trifluoroacétique (TFA) 0.1%, avant le prélèvement des échantillons peptidiques repris dans 10 µl de TFA 0.1%. Après rinçage du Zip-Tip dans du TFA 0,1% les peptides retenus sur la colonne sont élués par un gradient d'acétonitrile (15%, 25%, 50% et 80%)/ TFA 0,1%, et séchés au Speedvac.

IV-1-5 - Spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'identité des protéines est déterminée à partir de l'empreinte peptidique obtenue par spectrométrie de masse en MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight) sur un appareil Voyager-DE^{MD} STR Biospectrometry^{MD} (Applied Biosystem).

Une fraction représentant 1/5^{ème} des peptides dessalés, mélangée à 1 µl de matrice (acide dihydroxybenzoïque (Sigma) 10 mg/ml, dans méthanol 70% / H₂O 30%, TFA 0,1%) est déposée sur la cible MALDI et séchée à température ambiante jusqu'à ce qu'une cristallisation périphérique caractéristique de la matrice puisse être observée.

L'analyse des peptides est réalisée en mode réflectron positif avec un laser à azote réglé à 337 nm avec une tension d'accélération de 20 kV. Une centaine d'acquisitions sont réalisées par échantillon pour obtenir un spectre. Chaque spectre est calibré grâce à un standard externe composé d'une solution de bradykinine (m/z 757,40 Da), d'angiotensine II humaine (m/z 1046,54 Da), d'un fragment 18-39 d'ACTH humaine (m/z 2465,20 Da) et de l'insuline bovine (m/z 3494,65 Da).

IV-1-6 - Recherche dans les banques de données

L'identification des protéines se fait par recherche dans les banques de données protéiques Swiss-Prot et NCBI à l'aide du module MS-Fit des moteurs de recherche Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>) et Mascot (<http://www.matrixscience.com/>). L'interrogation des banques de données se fait grâce aux masses monoisotopiques de l'ensemble des pics du spectre MALDI-TOF. Une erreur de masse de 0,05 Da est tolérée pour la masse moléculaire des peptides. Différents critères tels que la carbamidométhylation ainsi qu'une possible modification par l'acrylamide des cystéines et l'oxydation des méthionines, sont pris en compte lors des recherches. Enfin, la masse moléculaire apparente de la protéine, déterminée à partir des gels d'électrophorèse avec une erreur de 20% permet d'affiner les interrogations faites dans les banques de données.

À l'issue de ces interrogations, plusieurs protéines candidates peuvent être retenues. Le nombre de peptides du spectre appartenant à la protéine, le pourcentage de séquence peptidique recouverte, le « score », permettent de réduire le nombre de candidats potentiels. Enfin, l'empreinte peptide obtenue lors des analyses est comparée avec l'empreinte peptidique théorique de(s)/de la protéine(s) candidate(s) obtenue(s) *via* le site Expasy (<http://us.expasy.org/tools/peptident.html>) afin de confirmer l'identité de la protéine.

IV-2 - Western-blot

IV-2-1 - Production d'anticorps polyclonaux anti-OBP bovine chez le lapin

L'isoforme majoritaire de l'OBP bovine purifiée à partir des RM de mâle par chromatographie échangeuse d'ion (cf. paragraphe III-4) et identifiée par spectrométrie de

masse MALDI-TOF est utilisée pour produire des anticorps polyclonaux dirigés contre l'OBPb.

Après prélèvement de sérum pré-immun, un lapin de race néozélandaise est immunisé par injection sous-cutanée de cette protéine purifiée. La première immunisation se fait avec 500 µg de protéines en solution dans 500 µl de liquide physiologique apyrogène émulsionné en présence d'adjuvant complet de Freund (contenant 5 mg/ml de mycobactéries, Sigma). Trois immunisations de rappel, espacées de trois semaines, sont réalisées avec 500 µg de protéines repris dans 1 ml d'un mélange volume à volume de liquide physiologique et d'adjuvant de Freund incomplet. À l'issue du troisième rappel, un prélèvement sanguin est réalisé afin de suivre la réponse immune. Le sérum immun (20 ml) est prélevé 15 jours après la dernière immunisation et testé contre la protéine injectée et les protéines totales extraites des différents tissus bovins.

IV-2-2 - Electrotransfert

Après électrophorèse, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) de type ImmobilonP (Millipore) en tampon Tris 20 mM, glycine 192 mM (avec 20% de méthanol en conditions dénaturantes). Préalablement au transfert, la membrane de PVDF est activée dans du MeOH durant 1 min, puis rincée dans de l'eau MilliQ (Millipore) et enfin équilibrée dans le tampon de transfert pendant 5 à 10 min. Le transfert se fait à courant constant (400 mA) pendant 1 heure à 4°C. Une coloration avec une solution de rougeponceau (30%) permet de vérifier le transfert correct des protéines.

IV-2-3 - Révélation par anticorps

Le blocage des sites non spécifiques se fait par incubation des membranes dans une solution de TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6) lait 5%. Les membranes sont ensuite incubées pendant une heure avec les anticorps primaires polyclonaux anti-OBP bovine dilués au 1/30 000^{ème} dans le TBS-T. Après 3 lavages de 10 min en TBS-T, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-Ig de lapin couplé à la peroxydase (Amersham Bioscience) dilué au 1/50 000^{ème} dans le TBS-T pendant 1 heure. La révélation des membranes se fait après 3 lavages de 10 min dans le TBS-T, par une incubation de 5 min dans une solution chimioluminescente (kit « ECL Plus Western Blotting Detection Reagent », Amersham Biosciences) avant d'être exposée à un film photographique (Hyperfilm MP, Kodak).

V - Etudes des modifications post-traductionnelles

V-1 - Analyses bioinformatiques

La prédiction des modifications post-traductionnelles potentielles est réalisée à l'aide de différents algorithmes informatiques disponibles sur le site www.expasy.org/tools, via les moteurs de recherche :

- NetPhos (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/)
- NetNGlyc (www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)

Le moteur de recherche NetPhos permet la prédiction de phosphorylations sur les acides aminés sérine (S), thréonine (T) et tyrosine (Y) d'une séquence protéique donnée. Le moteur de recherche NetNGlyc permet la prédiction des sites de N-glycosylation présents sur une protéine eucaryote dans le cadre de la séquence consensus « N-X-S/T ».

V-2 - Etude de la phosphorylation

V-2-1 - Immunodétection avec des anticorps anti-phosphorylation

Les anticorps utilisés pour l'immunodétection des phosphorylations sont des anticorps polyclonaux spécifiques de chaque acide aminé phosphorylé : anti-phosphosérine, anti-phosphothréonine et anti-phosphotyrosine produits chez le lapin (Zymed).

Quinze µg de protéines sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes et transférés sur membranes de PVDF selon les protocoles décrits dans les paragraphes III-3 et IV-2-2. Le blocage des sites non spécifiques se fait par incubation des membranes dans une solution de TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6), BSA 3% pendant une heure. La membrane est ensuite hybridée avec les anticorps polyclonaux anti-phosphosérine, ou -thréonine ou -tyrosine dilués au 1/750^{ème} dans le TBS-T pendant une heure. Trois rinçages en TBS-T sont effectués avant l'incubation avec l'anticorps secondaire anti-Ig de lapin couplé à la peroxydase, dilué au 1/50 000^{ème} dans le TBS-T pendant une heure. La révélation des membranes se fait après 3 lavages de 10 min dans le TBS-T par une incubation de 5 min dans une solution chimioluminescente (kit « ECL Plus Western Blotting Detection Reagent», Amersham Biosciences) avant d'être exposée à un film photographique (Hyperfilm MP, Kodak).

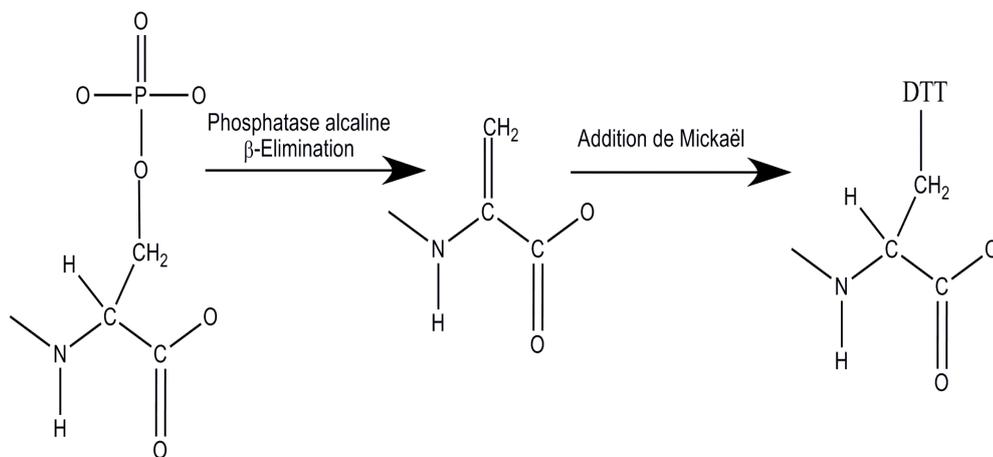


Figure M-3 - Schéma réactionnel du BEMAD (β-élimination suivie d'une addition de Michael) effectué sur un résidu sérine. Le groupement carbonyle résultant de l'action d'une phosphatase alcaline couplée à une β-élimination ménagée est substitué par un groupement DTT *via* une attaque nucléophile. La masse du peptide résultant correspond à la masse du peptide non phosphorylé plus la masse du DTT soit 136,2 Da.

V-2-2 - Localisation des sites de phosphorylation par la méthode du BEMAD

V-2-2-1 - Principe

Les sites de phosphorylation des protéines sont déterminés par la technique du BEMAD (Beta-Elimination followed by Michael Addition of Dithiothreitol) décrite par Wells *et al.* (2002) et schématisée dans la figure M-3. Cette technique permet la substitution des groupements phosphates, labiles lors des analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF, par un groupement DTT de 136,2 Da, non labile, sur des peptides. Ces peptides sont alors facilement identifiables par comparaison avec la carte peptidique théorique de la protéine obtenue après analyse par spectrométrie de masse.

V-2-2-2 - BEMAD

Les bandes protéiques d'intérêt sont découpées à partir d'un gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie colloïdal. La bande protéique décolorée et déshydratée est soumise à une digestion par la trypsine comme décrit dans le paragraphe E-1-2 mais sans traitement préalable de réduction/alkylation, évitant l'ajout de DTT sur les cystéines libérées. Les peptides issus de la digestion tryptique sont repris dans une solution de Tris 50 mM contenant 1 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂) et 1 unité de phosphatase alcaline (Roche). La réaction est incubée durant toute la nuit à 37°C, puis séchée au Speedvac. Les peptides secs sont soumis à une β-élimination ménagée et à une addition de Michael avec DTT par reprise des échantillons dans 200 µl de solution « BEMAD » (triéthylamine 1%, NaOH 0.1%, éthanol 20%, DTT 10 mM), et incubation à 50°C pendant 2,5 heures. La réaction est stoppée par ajout d'acide trifluoroacétique à une concentration finale de 1%. Les peptides sont purifiés à l'aide de colonnes en phase inverse Vivapure C18 (Sartorius) en utilisant différentes concentrations d'acétonitrile (12, 25, 50 et 80%) dans du TFA 0.1% puis séchés. Les peptides modifiés par l'ajout de DTT sont enrichis par purification sur colonne de thiol et les sels sont éliminés par passage sur Zip-Tip µC18. Les peptides sont directement élués dans la matrice (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique à 10 mg/ml, acide trifluoroacétique à 0.1%, acétonitrile à 50%) et analysés par MALDI-TOF comme décrit dans le paragraphe V-1-5.

V-3 - Etude de la glycosylation : Immunodétection par les lectines

Quinze microgrammes de protéines sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes et transférés sur membranes de PVDF selon les protocoles décrits dans les

Amorces	Séquence	S/AS	Origine des séquences
Amorces oligonucléotidiques du kit FirstChoice® RLM-RACE utilisées lors des 5'RACE			
5'RACE Outer Primer	5'-GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3'	S	FirstChoice® RLM-RACE Kit, Ambion, Applied Biosystems
5'RACE Inner Primer	5'-GCGGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG-3'	S	
Amorces oligonucléotidiques utilisées pour les RT-PCR et 5'RACE			
5'OBPb	5'-GGCCC <i>ATGA</i> AGGTTCTGTTCTGACT-3'	S	XM_001502818.1
3'OBPb	5'-TTTAAAT <i>CA</i> CTCGGGGTGAGGATGGTC-3'	AS	XM_001502818.1
Amorces oligonucléotidiques utilisées pour le clonage dans pPic3.5K			
5'SnaBI	5'-GCGCCCTACGTA <i>ATGA</i> AGGTTCTGTTCTGACTCTTCTC-3'	S	XM_001502818.1
3'AvrII	5'-TTAATTCCTAGG <i>CA</i> CTCGGGGTGAGGATGGTCTTCATT-3'	AS	XM_001502818.1
Amorces nucléotidiques utilisées pour la mutagenèse dirigée de la séquence codant l'OBPb			
5'OBPbMut	5'-CAAGAAGAGGAAGCTGAGCAA <i>GCT</i> CTCTCAGAGCTTTCAGAGC-3'	S	XM_001502818.1
3'OBPbMut	5'-GCTCTGAAAGCTCTGAGAG <i>AGCT</i> TGCTCAGCTTCCTCTTCTTG-3'	AS	XM_001502818.1
Amorces nucléotidiques utilisées pour les séquençages des inserts dans les plasmides			
M13 forward	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'	S	pCR®2.1-TOPO, Invitrogen
M13 reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	AS	pCR®2.1-TOPO, Invitrogen
5' AOX1	5'-GACTGGTTCCAATTGAC-3'	S	pPIC3.5K, Invitrogen
3' AOX1	5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'	AS	pPIC3.5K, Invitrogen

Tableau M-4 - Nom, séquence et référence des amorces nucléotidiques choisies pour l'amplification et la mutagenèse de l'ADNc codant l'OBP bovine et pour l'insertion dans le vecteur de clonage pPic3.5K. Les sites de restrictions (*SnaBI* pour 5'SnaBI OBPb et *AvrII* pour 3'AvrII), les codons Start (ATG) et Stop (TCA) sont indiqués en italique, en gras en vert et en rouge respectivement. Les codons permettant la mutation de l'asparagine 9 en alanine 9 sont indiqués en gras et rose. Les lettres S et AS désignent respectivement les amorces sens et antisens.

paragraphe III-3 et IV-2-2. Après transfert, les sites non spécifiques de la membrane sont bloqués toute la nuit à 4°C par incubation dans une solution de TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, pH 7,5) PolyVinylPyrrolidone (PVP) 2%. Une incubation d'une heure avec les lectines couplées à la digoxigénine diluées au 1/2000^{ème} dans du TBS-T PVP 2% est réalisée. Après 3 lavages au TBS-T, un second blocage avec l'agent bloquant du kit « DIG Glycan Differentiation » (Roche) est effectué pendant 30 min. Une incubation avec l'anticorps anti-digoxigénine dilué au 1/4000^{ème} est effectuée pendant une heure précédée et suivie de trois lavages dans le TBS-T. Après deux derniers rinçages dans du TBS-T, les membranes sont révélées dans une solution Chimiluminescente (Millipore) avant d'être exposées à un film photographique (Kodak).

VI - Isolement de la séquence complète de l'ADN codant l'OBP bovine dans la muqueuse respiratoire

VI-1 - Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux (ARNt, ARNr et ARNm) des MR sont extraits à partir des tissus conservés à -80°C dans le RNAlater. Vingt mg de tissu sont disséqués et traités selon le protocole du kit « RNeasy extraction kit » (QIAGEN). L'élution des ARN est effectuée avec 50 µl d'eau PPI (préparation pour injection). La concentration et la pureté des ARN sont déterminées par spectrophotométrie (ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop) respectivement par la mesure de l'absorbance à 260 nm et par le calcul du rapport des absorbances 260 nm/280 nm de l'échantillon.

VI-2 - Synthèse et amplification de l'ADN complémentaire (ADNc) de l'OBPb

L'ADNc codant l'OBPb est obtenu à l'aide du kit « OneStep RT-PCR » (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) (QIAGEN) en utilisant les amorces 5'OBPb et 3'OBPb (Tableau M-4) dessinées à partir de la séquence de l'ARN messager prédit de l'OBPb (numéro d'accèsion GenBank XM_001253218.1). Le kit permet de produire et d'amplifier une séquence codante à partir d'ARNm grâce à un mélange enzymatique composé de deux transcriptases inverses (*Omniscript* et *Sensiscript*) et d'une ADN polymérase (*HotStarTaq*).

Cinq cents nanogrammes d'ARN sont mis en présence de 400 µM de chaque dNTP, de 0,6 µM des amorces 5'OBPb et 3'OBPb, du tampon du kit et de 2 µl du mélange enzymatique dans un volume réactionnel final de 50 µl. La transcription inverse se fait à 50°C pendant 30

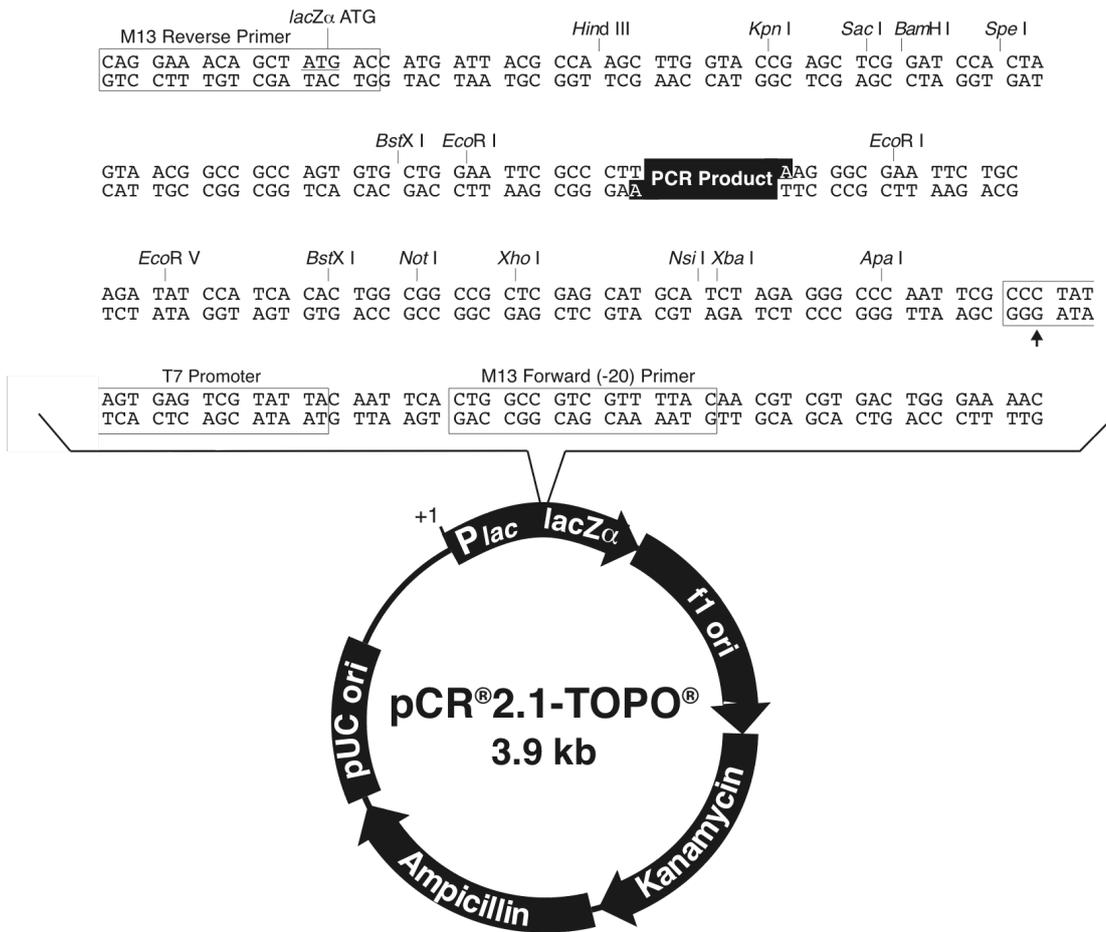


Figure M-4 - Carte de restriction du vecteur *pCR*[®] 2.1-*TOPO*[®]

min et est directement suivie de l'étape d'amplification dans un thermocycleur (Biorad). Après l'activation de la *HotStarTaq* ADN polymérase durant 15 min à 95°C, 35 cycles d'amplification (1 min à 94°C, 1 min à 60°C, 1 min à 72°C) sont réalisés avant une élongation finale de 10 min à 72°C. Une électrophorèse des produits de RT-PCR est réalisée pour vérifier la taille des transcrits obtenus dans un gel d'agarose de 1% contenant 0,5% de bromure d'éthidium. La migration se fait dans le tampon TAE (Tris 10 mM, acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8) durant 40 min à voltage constant (100 V).

VI-3 – Clonage de l'ADNc de l'OBPb

VI-3-1 – Ligation et transformation bactérienne

L'ADNc obtenu précédemment est cloné dans un vecteur *pCR2.1-TOPO*[®] (Figure M-4) à l'aide du kit de clonage TOPO TA (Invitrogen). Après transformation des bactéries *Escherichia coli* Top10 par choc thermique conformément au protocole décrit par le fournisseur, les cellules sont étalées sur milieu sélectif LB (Luberia Bertani ; tryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 1%) en présence de 50 mg/ml d'ampicilline (LBA50), afin d'isoler les colonies bactériennes transformées.

VI-3-2 - PCR sur colonies

Une PCR sur colonies est réalisée avec l'ADN polymérase *pfx50* (Invitrogen) sur une dizaine de clones pour vérifier l'intégration de la séquence d'ADNc de l'OBPb dans le plasmide. Dans un volume final de 50 µl, une colonie est mise en présence de 5 unités de *pfx50*, du tampon de l'enzyme, 0,3 mM de chaque dNTP et de 0,3 µM des amorces 5'OBPb et 3'OBPb (Tableau M-4). Une étape de dénaturation de 2 min à 94°C, suivie de 35 cycles de PCR (15 sec de dénaturation à 94°C, 30 sec d'hybridation à 60°C et 1 min d'élongation à 68°C) et d'une élongation finale de 5 min à 68°C composent la réaction de PCR.

VI-3-3 - Extraction des ADN plasmidiques et vérification des inserts

Les colonies positives après la PCR sur colonies sont mises en culture sous agitation à 37°C pendant 15 h dans 3 ml de milieu LBA50. Les plasmides ainsi amplifiés sont extraits à l'aide du kit « QIAprep[®] Spin Miniprep » (QIAGEN), et séquencés par la société Genoscreen (Lille) avec les amorces spécifiques du plasmide *pCR2.1-TOPO*[®] (M13 et REV) afin de vérifier l'intégration de la séquence codante de l'OBPb dans le plasmide *pCR2.1-TOPO*[®]-OBPb.

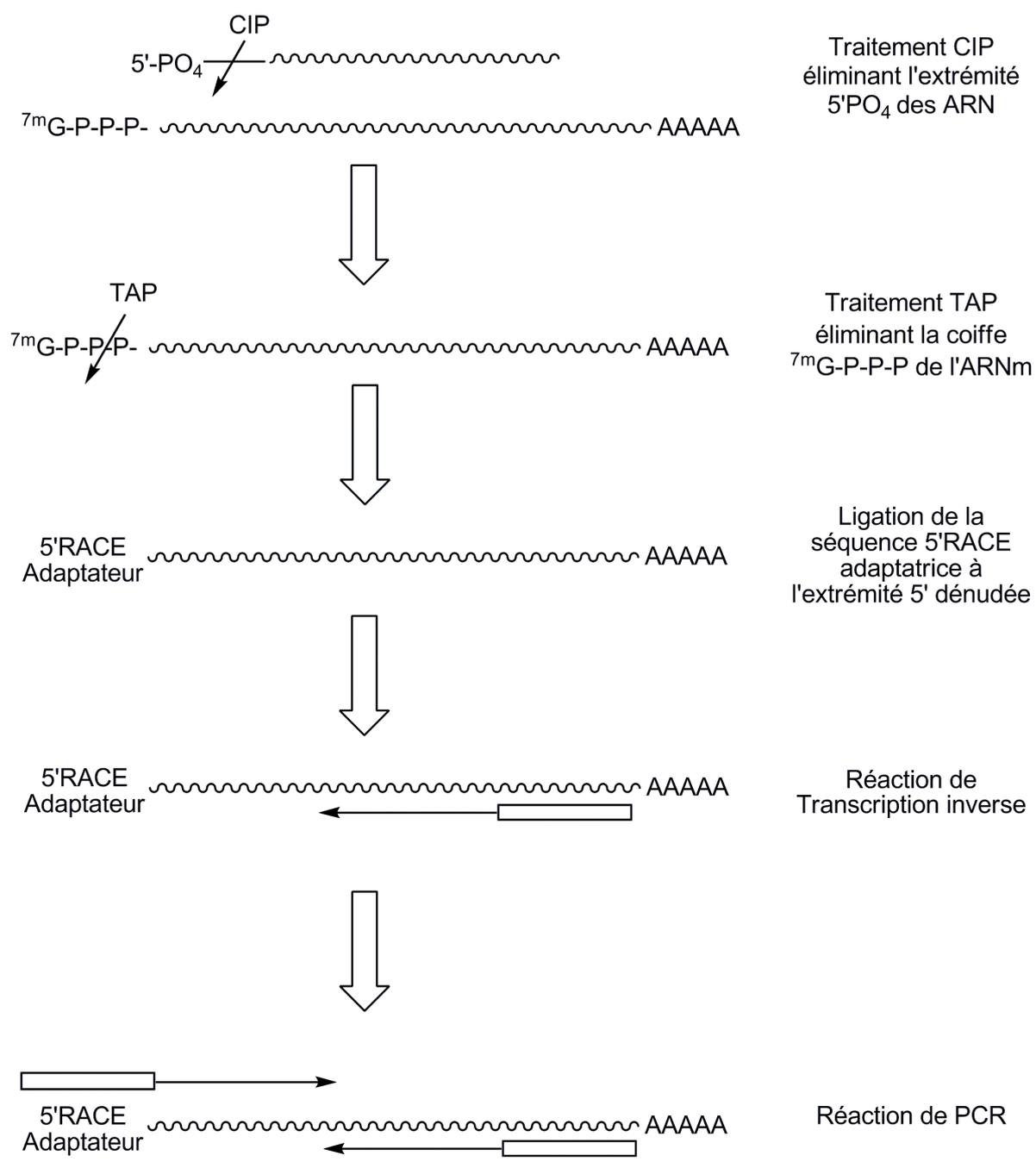


Figure M-5 - Schéma de la 5'RACE effectuée à l'aide du kit « FirstChoice[®] RLM-RACE » (Ambion)

VI-4 - 5' RACE-PCR

Afin de rechercher une hétérogénéité de l'extrémité 5' terminale des transcrits de l'ADNc codant l'OBPb, la technique de « RACE-PCR » (Rapid Amplification of cDNA Ends PCR) a été utilisée grâce au kit « FirstChoice[®] RLM-RACE » (Ambion) à partir d'ARN totaux extraits des RM de mâle et de femelle. Ce kit permet l'ajout d'un motif « 5'-RACE Adapter » sur les ARNm (Figure M-5). Les ADNc produits par une transcription inverse sont amplifiés par l'utilisation d'amorces internes spécifiques du gène en combinaison avec les amorces spécifiques du motif « 5'-RACE Adapter » fournis dans le kit (Tableau M-4).

Les réactions de PCR sont réalisées avec l'ADN polymérase *HotStart*. Une étape de dénaturation d'1 min à 94°C, suivie de 30 cycles de PCR (30 sec de dénaturation à 94°C, 30 sec d'hybridation à 60°C et 3 min d'élongation à 72°C) et d'une élongation finale de 7 min à 72°C composent la réaction de PCR permettant l'amplification.

Les produits obtenus sont visualisés sur gel d'agarose 1%, et purifiés à l'aide du kit « MinElute[™] Gel extraction » (QIAGEN) avant d'être clonés dans le vecteur *pCR2.1-TOPO*[®] du kit de clonage TOPO-TA (Invitrogen) et séquencés par la société Genoscreen (Lille).

VII - Expression des protéines recombinantes en système hétérologue *Pichia pastoris*

VII-1 - Principe

Le système hétérologue *P. pastoris* est un système de production de protéines recombinantes qui permet de produire de grandes quantités de protéines (en moyenne 10 mg/l) bien conformées et de réaliser les modifications post-traductionnelles classiques des protéines (phosphorylations, glycosylations). *P. pastoris* est une levure méthylotrophe capable de métaboliser le méthanol comme seule source de carbone. La première étape du métabolisme du méthanol est son oxydation en formaldéhyde par l'enzyme oxydase alcoolique avec production de peroxyde d'hydrogène.

Le gène d'intérêt est intégré au génome en aval du promoteur de l'oxydase alcoolique (AOX1) inductible au méthanol. Les protéines recombinantes sont sécrétées dans le milieu de culture grâce à leur séquence signal. *P. pastoris* sécrétant peu de protéines intrinsèques et le milieu de culture ne contenant pratiquement que la protéine surexprimée, sa purification en est facilitée.



Figure M-6 - Carte de restriction du vecteur *pPIC3.5K*. Ce vecteur est utilisé pour l'expression des protéines recombinantes en système hétérologue *P.pastoris*. La linéarisation du plasmide se fait avec l'enzyme de restriction *SacI*. Les sites de restriction utilisés pour cloner l'insert codant l'OBPb sont « *SnaBI* » et « *AvrII* ».

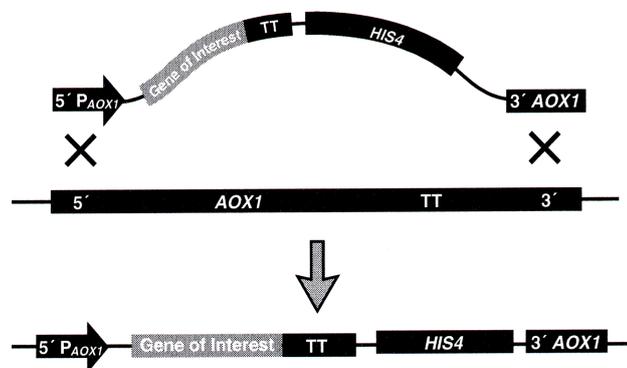


Figure M-7 - Recombinaison et intégration du plasmide dans le génome de *P.pastoris* par double recombinaison homologue

Le vecteur d'expression choisi est le plasmide *pPIC3.5K* (9kb) (Figure M-6). Ce plasmide contient les gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine permettant l'expression constitutive chez *E. coli* et *P. pastoris*. En outre, ce vecteur contient une origine de répllication d'*E. coli* permettant la multiplication du plasmide dans la bactérie. Ce plasmide n'est pas répliqué par *P. pastoris* mais la séquence d'intérêt est intégrée au génome par recombinaison homologue au niveau du promoteur du gène AOX (Figure M-7). Une fois le gène d'intérêt cloné dans le plasmide *pPIC3.5K*, le plasmide est linéarisé pour favoriser la recombinaison homologue qui permet l'intégration de la séquence codant la protéine à produire dans le génome de la levure.

Dans la souche de levure GS115 déficiente en gène His4 que nous avons utilisée, un remplacement de gène se produit par double crossing-over entre le promoteur AOX1 et la région codante 3' du gène AOX1. De ce crossing-over résultent des cellules transformées de phénotype His⁺Mut⁺ ayant une bonne croissance sur un milieu sans histidine et une croissance lente sur milieu dextrose, ce qui nous permet de réaliser la sélection des clones transformés.

VII- 2 - Préparation des vecteurs d'expression

VII-2-1 - Préparation du vecteur d'expression *pPIC3.5K-OBPb*

VII-2-1-1 - Amplification de l'insert codant l'OBPb

Des amorces spécifiques sont dessinées afin de pouvoir insérer la séquence codante de l'OBPb dans le vecteur d'expression *pPIC3.5K* (Figure M-5). Ces amorces sont composées de 2 codons « coiffes » protégeant les sites de restriction, des sites de restriction (pour les enzymes *SnaBI* et *AvrII*) et des codons du gène codant l'OBPb. Les PCR d'amplification sont réalisées avec une ADN polymérase possédant une activité 3' exonucléase (auto-correctrice), la *HotStart* High Fidelity (Qiagen), selon le programme suivant : 1 min de dénaturation à 94°C, suivie de 35 cycles (1 min à 94°C, 1 min à 60°C, 1 min à 72°C) se finalisant par une étape d'élongation de 10 min à 72°C. Les amplicons sont déposés sur gel d'agarose à 1%, extraits du gel à l'aide du kit d'extraction « QIAquick Gel Extraction kit » (Qiagen) et dosés par spectrophotométrie.

VII-2-1-2 - Clonage de l'insert dans le vecteur *pPIC3.5K*

L'ADNc codant l'OBPb, *OBPb* (insert) et le plasmide *pPIC3.5K* sont digérés successivement par les enzymes de restriction *SnaBI* et *AvrII* (BioLabs). Une première digestion par l'enzyme *SnaBI* est réalisée sur 3 µg de plasmide et 2 µg d'insert dans le mélange réactionnel suivant : 15 unités de *SnaBI* dans son tampon NEB4 en présence de BSA.

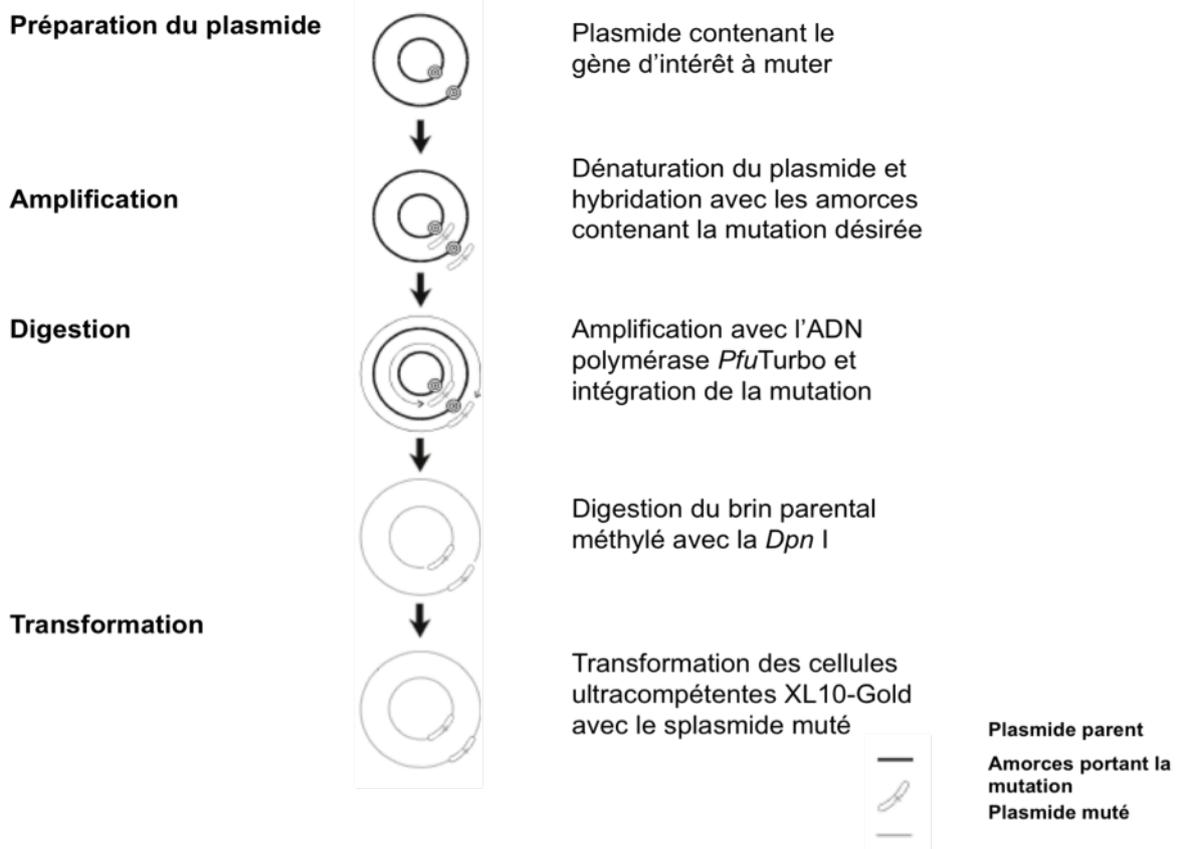


Figure M-8 - Schéma récapitulatif du principe de mutagénèse dirigée réalisée à l'aide du kit « QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis ». Le plasmide contenant la séquence à muter est amplifié à l'aide d'amorces spécifiques présentant le codon de mutation. Les bris parentaux méthylés sont ensuite éliminés par digestion enzymatique à l'aide de *Dpn I* et le plasmide fils muté est utilisé pour transformer les cellules XL10-Gold.

Ce mélange est incubé pendant 1,5 heure à 37°C et l'ADN digéré est purifié à l'aide du kit d'extraction « MinElute PCR Extraction kit » (Qiagen). La seconde digestion est ensuite réalisée par l'enzyme *AvrII* dans un volume réactionnel final de 50 µl en présence de 5 unités d'*AvrII* et de son tampon, NEB 2, pendant 1,5 heure à 37°C. Les produits de digestion sont purifiés à l'aide du kit « CleanUp MinElute kit » (Qiagen). Une dernière étape de ligation à l'aide de la T4 DNA ligase permet l'obtention du vecteur d'expression de l'OBPb recombinante (recOBPb) : *pPIC3.5K-OBPb*. Pour cela, 1 unité de T4 DNA ligase en présence de son tampon de ligation est incubée avec 20 ng d'insert digéré pour 100 ng de plasmide digéré pendant 1 heure à température ambiante dans un volume final de 20 µl.

Des bactéries compétentes (45 µl) de la souche Top 10F' (Invitrogen) sont mises en contact avec 500 ng du plasmide *pPIC3.5K-OBPb* issu de la réaction de ligation. Après 20 min sur glace, les bactéries sont soumises à un choc thermique à 42°C pendant 30 sec puis replacées 10 min sur glace, avant l'ajout de 500 µl de milieu SOC (tryptone 2%, extrait de levure 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, dextrose 20 mM). Après 1 heure d'incubation à 37°C sous agitation à 225 rpm, les cellules Top 10F' sont étalées sur milieu gélosé LBK50 (LB, kanamycine 50 mg/ml) et incubées à 37°C pendant la nuit.

La présence de l'insert est vérifiée par PCR sur colonie avec les amorces 5'OBPb et 3'OBPb sur dix clones des bactéries transformées. La présence des fragments amplifiés a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5%. Un clone positif en PCR est amplifié dans 3 ml de milieu LBK50 liquide sous agitation à 225 rpm à 37°C pendant 15 heures. Les plasmides sont purifiés selon les instructions du fournisseur du kit « QIAprep® Spin Miniprep kit » (Qiagen) et séquencés à l'aide des amorces commerciales du kit (5'AOX1 et 3'AOX1) par la société Genoscreen (Lille).

VII-2-2 - Préparation du vecteur d'expression mutant *pPIC3.5K-bOBPN9A* par mutagenèse dirigée

VII-2-2-1 - Principe de la mutagenèse dirigée à l'aide du kit « QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis » (Stratagène)

Le kit « QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis » permet à partir d'un plasmide parental et de deux amorces complémentaires portant la mutation souhaitée, de produire un plasmide muté. Une digestion par l'enzyme *DpnI* permet dans un second temps d'éliminer le brin parental (méthylé) au profit du plasmide portant la mutation (non méthylé). Le plasmide ainsi muté peut être amplifié après transformation de cellules compétentes (Figure M-8).

VII-2-2-2 - Mutagénèse

Deux amorces complémentaires contenant la mutation souhaitée ont été dessinées (Tableau M-4), 5'OBPbMut et 3'OBPbMut. Elles permettent de muter le codon codant l'asparagine 9 (Asn (N) 9), portant la glycosylation, en alanine 9 (Ala (A) 9) à partir du plasmide *pPIC 3.5K-OBPb*.

La réaction de mutagénèse se fait par PCR dans un volume final de 50 µl à partir de 20 ng d'ADN plasmidique en présence de 0,85 pmole de chaque amorce (5'OBPbMut et 3'OBPbMut), de 1 µl de dNTP mix, de 3 µl QuickSolution et de 2,5 unités de la *PfuUltra*[®] ADN polymérase. La première étape de dénaturation se fait pendant 1 min à 95°C et est suivie de 18 cycles de 50 sec à 95°C, 50 sec à 60°C et d'1 min à 68°C. Une étape d'élongation finale de 7 min à 68°C est enfin réalisée. Après vérification sur gel d'agarose de la présence du plasmide, 10 unités de l'enzyme de restriction *Dnp* I sont ajoutées à la réaction de PCR, et le tout est incubé pendant 1 heure à 37°C. Le plasmide *pPIC3.5K-OBPbN9A*, vecteur d'expression de l'OBPb mutée recombinante (OBPbN9A), est ainsi produit.

VII-2-2-3 - Transformation des bactéries XL10-GOLD

Après digestion, des bactéries ultra-compétentes XL10-GOLD (fournies dans le kit) sont transformées par l'ADN plasmidique muté. Pour cela, 2 µl du plasmide *pPIC3.5K-OBPbN9A* sont ajoutés à 45 µl de cellules ultra-compétentes et incubés en présence de 2 µl de β-mercaptoéthanol pendant 10 min sur glace. Un choc thermique à 42°C pendant 30 sec est appliqué au mélange, avant incubation 2 min sur glace. Enfin, 500 µl de milieu NZY⁺ (NZ amine (hydrolysate de caséine) 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 0,5%) sont ajoutés au mélange avant incubation pendant 1 h à 37°C sous agitation à 225 rpm.

VII-3 - Transformation des cellules GS115 *P. pastoris*

VII-3-1 - Principe

Une fois le gène d'intérêt cloné, le plasmide est linéarisé pour favoriser sa recombinaison avec le gène *AOX1* et donc son intégration dans le génome de la levure. Dans une souche déficiente en gène *His4*, comme la souche GS115 que nous avons utilisée, le remplacement du gène *AOX1* se produit par double crossing-over entre sa région promotrice et sa région codante en 3'. De ce crossing-over résultent des cellules transformées de phénotype His⁺Mut⁺ ayant une bonne croissance sur milieu sans histidine et une croissance lente sur milieu méthanol.

VII-3-2 - Linéarisation des plasmides

Dix microgrammes des plasmides *pPIC3.5K-OBPb* et *pPIC3.5K-OBPbN9A* sont linéarisés par digestion avec 30 unités de l'enzyme de restriction *SacI* (BioLabs), à 37°C pendant 1,5 heure en présence du tampon de l'enzyme NEB4 et de BSA.

VII-3-3 - Préparation des cellules GS115 *P. pastoris*

Les cellules GS115 à transformer sont étalées sur milieu gélosé YPD (extrait de levure 1%, peptone 2%, dextrose 2%) à partir d'une collection conservée à -80°C et incubées à 29°C pendant 48h. Une colonie de cellules isolées sert à ensemercer 10 ml de milieu liquide YPD, incubé et agité pendant 8 heures à 29°C. Cette pré-culture est inoculée dans 125 ml de milieu YPD liquide et incubée pendant une nuit à 29°C sous agitation. Quand l'absorbance à 600 nm ($DO_{600\text{ nm}}$) du milieu est comprise entre 1,3 et 1,5, les cellules sont culotées par centrifugation à 3500 rpm, 10 min à 4°C. Le surnageant de culture est éliminé et le culot cellulaire est repris par 25 ml d'YPD-Hepes, plus 0,625 ml de DTT 1 M et incubé au bain-marie à 30°C pendant 15 min. Après cette incubation, 100 ml d'eau stérile sont ajoutés et ce mélange est centrifugé à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est lavé avec 62,5 ml d'eau stérile et centrifugé à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C. Enfin le culot est repris dans 5 ml de sorbitol 1 M et centrifugé à 3000 rpm, 10 min à 4°C. A l'issue de cette dernière centrifugation, les cellules de levures rendues compétentes sont reprises dans 1,25 ml de sorbitol 1 M.

VII-3-4 - Electroporation

Pour chaque électroporation, 80 µl de cellules compétentes sont déposées sur l'ADN plasmidique linéarisé dans une cuve d'électroporation froide. L'électroporation se fait avec un électroporateur Electro Cell Manipulator® (BTX Electroporation System) dans les conditions suivantes : $R = 48\ \Omega$, $S = 2,25\ \text{kV}$, $C = 25\ \mu\text{F}$ et $T = 52,1\ \text{A}$. Après application du courant électrique, 1 ml de sorbitol 1 M est ajouté dans le milieu pour renforcer les cellules puis la cuve est placée à 29°C pendant 2 heures.

VII-4 - Sélections des cellules GS115 transformées

La suspension de levure est étalée sur milieu sélectif gélosé MD (base de levure nitrogène avec sulfate d'ammonium sans acide aminé 1,34%, biotine $4 \times 10^{-5}\%$, dextrose 2%) et placée à 29°C durant 3 jours. Seules les cellules de phénotype His^+ pourront croître sur ce milieu dépourvu d'histidine.

Le second criblage consiste en la sélection des clones présentant plusieurs copies du gène codant l'OBPbN9A résistant à la généticine. Cette résistance des levures à la généticine est proportionnelle au nombre de copies du gène intégrées au génome : plus il y a de copies du gène, plus les levures sont résistantes à la généticine. Les colonies s'étant développées sur milieu MD (donc His+) sont repiquées sur milieux gélosés YPD contenant des concentrations de généticine croissantes, allant de 0,25 à 4 mg/ml, et incubées à 29°C pendant 3 jours. Au terme de cette incubation, les levures les plus résistantes sont repiquées sur milieu gélosé YPD.

Une sélection des clones producteurs de protéines recombinantes est ensuite réalisée. Pour cela, les colonies développées sur milieu YPD contenant de fortes concentrations de généticine sont inoculées dans 10 ml de BMGY (extrait de levure 1%, peptone 2%, base de levure nitrogène avec sulfate d'ammonium sans acide aminé 1,34%, tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 6, biotine 0,02%, glycérol 10%) et placées sous agitation à 229 rpm pendant 48h à 29°C. Les cellules sont culotées par centrifugation pendant 3 min à 2000 rpm. Les surnageants sont éliminés et les culots solubilisés dans 2 ml de milieu BMM (base de levure nitrogène avec sulfate d'ammonium sans acide aminé 1,34%, tampon phosphate de potassium 0,1 M pH 6, biotine 1X, méthanol 5%). Chaque culture est mise sous agitation à 229 rpm à 29°C pendant 2 jours. Les mini-cultures sont centrifugées à 13500 rpm, pendant 10 min à 4°C.

L'équivalent de 50 µl de surnageant séché au Speedvac est analysé par électrophorèse en conditions dénaturantes (cf. par. III-3) pour évaluer la production de protéines. L'intégrité des protéines recombinantes est vérifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (cf. par. IV-1).

VII-5 - Mise en collection

La colonie la plus productrice de protéines recombinantes est sélectionnée et mise en collection. Pour ce faire, elle est étalée sur un milieu riche gélosé YPD et incubée à 29°C. Après 48 heures de croissance, une colonie est inoculée dans 50 ml de milieu YPD et agitée une nuit à 29°C. Quand la $DO_{600\text{ nm}}$ atteint 1,5, la culture est centrifugée à 4500 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot de cellules est repris dans 1,5 ml de milieu YPD contenant 15% de glycérol. Après 15 min à température ambiante, le tube de collection est stocké à -80°C.

LB – Luria-bernati Medium	
Tryptone	1%
Extrait de levure	0.5%
NaCl	1%

MM – Minimal Methanol Medium	
Yeast Nitrogen Base	1.34%
Biotine	4x10 ⁻⁵ %
Méthanol	0.5%

MD – Minimal Dextrose Medium	
Yeast Nitrogen Base	1.34%
Biotine	4x10 ⁻⁵ %
Dextrose	2%

YPD – Yeast Extract Peptone Dextrose Medium	
Extrait de levure	1 %
Peptone	2 %
Dextrose	2%

BMM – Buffered Minimal Méthanol	
Tampon phosphate de potassium 1 M, pH 6	100 mM
Yeast nitrogen base	1.34%
Biotine	4x10 ⁻⁵ %
Méthanol	0.5%

BMGY – Buffered Glycérol-complex Medium	
Extrait de levure	1%
Peptone	2%
Tampon phosphate de potassium 1 M, pH 6	100 mM
Yeast Nitrogen Base	1.34%
Biotine	4x10 ⁻⁵ %
Glycérol	1%

Tableau M-5 - Composition des milieux utilisés pour l'amplification des plasmides et la croissance des levures GS115

VII-6 - Production des OBP recombinantes

Les cellules mises en collection sont étalées sur un milieu YPD gélosé et incubées à 29°C. Après 48h de croissance, une colonie est ensemencée dans une pré-culture de 10 ml de BMGY jusqu'à ce que la $DO_{600\text{ nm}}$ soit comprise entre 4 et 6. Deux cents ml de milieu BMGY (tampon phosphate de potassium 100 mM, pH 6, extrait de levure 1%, peptone 2%, Yeast Nitrogen Base 1,34%, biotine $4 \times 10^{-5}\%$, glycérol 1%) sont inoculés avec 200 μl de cette pré-culture et placés sous agitation à 229 rpm pendant 72 heures à 29°C. Lorsque le $DO_{600\text{ nm}}$ est comprise entre 40 et 60, la culture est centrifugée à 3500 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans 200 ml de BMM (tampon phosphate de potassium 100 mM, pH 6, Yeast Nitrogen Base 1,34%, biotine $4 \times 10^{-5}\%$, méthanol 0,5%) additionné d'antimousse (Antifoam 289, Sigma). La culture est replacée dans l'incubateur pendant 4 jours. Tous les jours à la même heure, 1 ml de culture est prélevé pour suivre la production protéique et 1 ml de méthanol est ajouté pour maintenir une concentration stable pendant la production. Au terme des 4 jours, les cultures sont centrifugées 10 min à 3500 rpm à 4°C. Le surnageant est prélevé et concentré au $1/10^{\text{ème}}$ sur des unités de concentration Vivaspin 20 (Sartorius) en utilisant une membrane de seuil de coupure de 3 kDa. Une dialyse de ces surnageants de culture concentrés est réalisée avec de grands volumes d'eau distillée pendant 2 jours à 4°C dans des tubes de dialyse SpectraPor[®] au seuil de coupure de 3 kDa. La concentration protéique est déterminée à l'aide du kit « $\mu\text{BCA Protein Assay Reagent}$ » (cf. paragraphe III-2), et les surnageants sont séchés au Speedvac et conservés à -20°C jusqu'à purification.

VII-7 - Purification des OBP recombinantes par chromatographie échangeuse d'anions

Les protéines recombinantes sont purifiées par chromatographie échangeuse d'anions sur un système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia). Des culots secs de 400 μg de protéines recombinantes sont repris dans du tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 (Tampon A) et déposés sur une colonne de chromatographie à échange d'anions Mono QTM 5/50 GL (GE Healthcare) équilibrée dans le tampon A. L'élution des protéines se fait par un gradient de sel à l'aide d'un tampon Tris/HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,5 (Tampon B) à raison de 1 ml/min en 40 min. La purification des protéines produites dans les mini-cultures se fait par chromatographie échangeuse d'anions sur un système Dionex conformément au

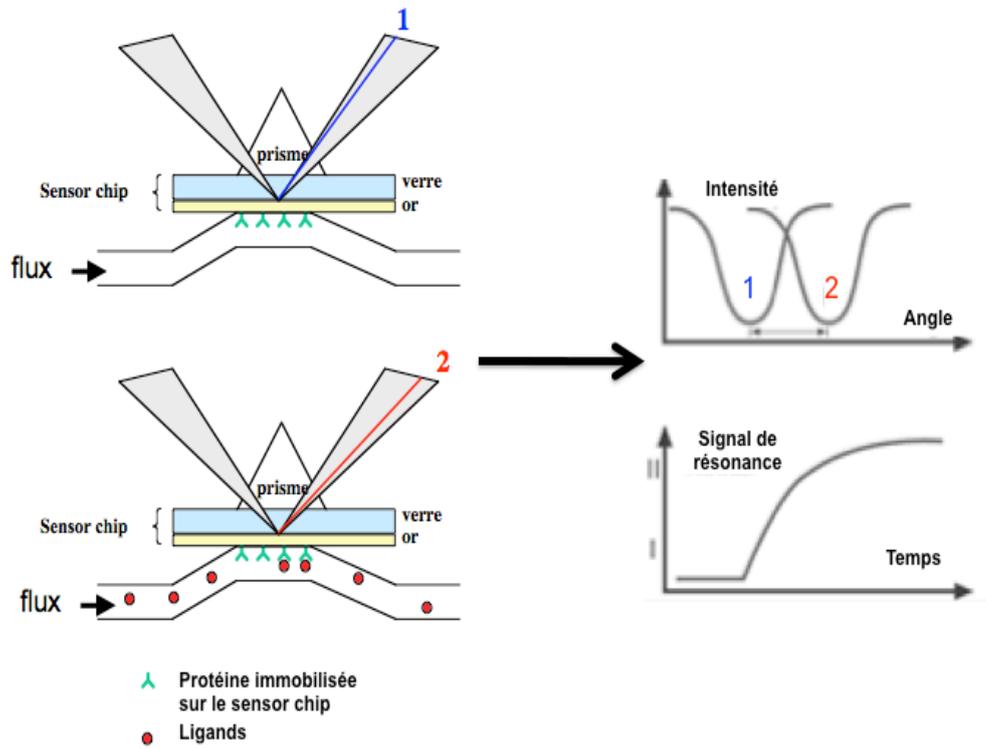


Figure M-9 - Principe de la résonance plasmonique de surface utilisée par le BIACORE

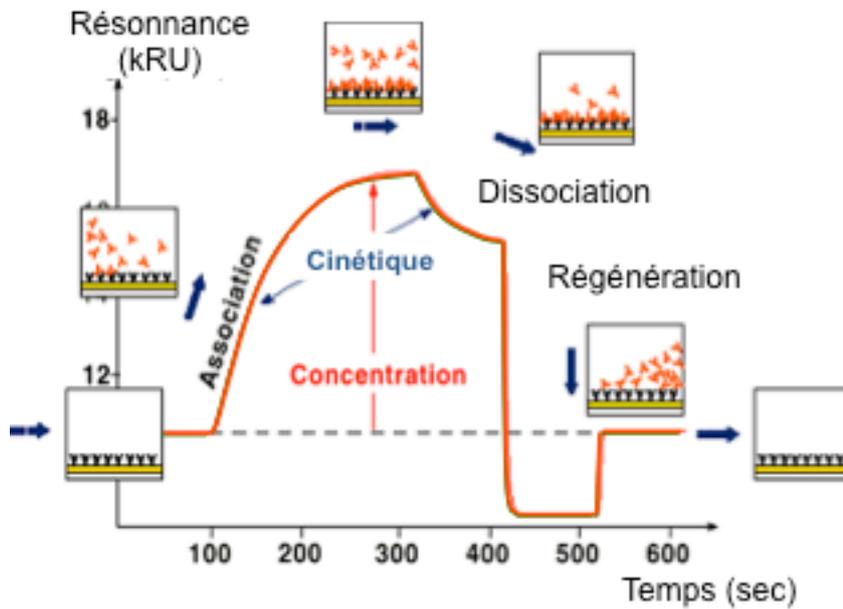


Figure M-10 - Sensorgramme

protocole décrit dans le paragraphe III-4. Après dialyse, les fractions contenant les protéines recombinantes purifiées sont dosées (kit « μ BCA Protein Assay Reagent », Pierce), séchées au Speedvac, aliquotées par lot de 2 μ M et stockées à -20°C.

VIII - Etude des propriétés de liaison des différentes isoformes d'OBPb

VIII-1 - Le BIAcore[®]

VIII-1-1 - Principe

Le BIAcore[®] est un biocapteur utilisant la résonance plasmonique de surface (Surface Plasmonic resonance, SPR) pour quantifier les interactions en temps réel entre deux partenaires moléculaires. Pour cela, l'un des partenaires (la protéine, dans notre cas) est immobilisé (de façon covalente ou non) à la surface d'une matrice, le sensor chip, et l'autre partenaire (le ligand potentiel) est injecté par un système microfluidique à la surface de celle-ci. La détection par SPR permet de quantifier les variations de l'angle de réflexion lumineuse ayant lieu à la surface de la matrice suite à la formation du complexe protéine-ligand (Figure M-9). Cette technique permet un suivi en temps réel des associations/dissociations des complexes et d'en déduire la valeur de la constante d'affinité. L'enregistrement du déplacement de l'angle de réflexion est enregistré sous forme de sensorgrammes, quantifiés en RU (response or resonance unit), unité arbitraire proportionnelle à la quantité de molécules fixées sur la protéine immobilisée (Figure M-10).

VIII-1-2 - Immobilisation de l'OBPp sur les sensor chips et analyse des interactions

Les expériences de résonance plasmonique de surface sont réalisées au laboratoire sur un appareil BIAcore 3000. Les protéines utilisées lors de ces études sont des OBP porcines recombinantes (rOBPp) que j'ai produites en cellules de levure *P. pastoris* dans le laboratoire (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009a). Trois matrices différentes sont utilisées comme support des protéines, les sensor chips CM5, SA et AU.

Chaque sensor chip est composé de quatre cellules indépendantes, ce qui permet de réaliser trois expérimentations en parallèle dans des conditions expérimentales distinctes, avec toujours une cellule contrôle. En effet, l'évaluation des liaisons non spécifiques à la protéine fixée au support (quel qu'il soit) se fait par analyse de cette cellule contrôle sur le sensor chip.

Elle est activée et inactivée sans immobilisation de protéine et les ligands potentiels sont injectés selon les mêmes procédures que les cellules testées.

VIII-1-2-1 - le sensor chip « CM5 »

Le sensor chip « CM5 » greffé par des chaînes de dextran carboxyméthylées permet la fixation des protéines *via* leurs groupements amines (NH₂-). Le couplage de la protéine au sensor chip se fait de façon covalente, selon la procédure décrite dans le kit d'immobilisation standard d'amine (BIAcore, GE Healthcare). Après activation de la surface du sensor chip avec du N-hydroxysuccinimide et du diméthylaminopropyl-N'-éthyl carbodiimide, 20 µM de rOBPp dilués dans une solution d'acétate de sodium 10 mM, pH 5, sont injectés à un débit de 5 µl/min. Les sites non occupés par la protéine sont inactivés par une solution d'éthylamine 1 M. L'acide myristique, ligand de l'OBPp, à une concentration de 100 nM dans du HBS-EP (Hepès 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 0,005% v/v, pH 7,4), éthanol 5% est injecté à un débit de 10 µl/min. La surface du sensor chip est régénérée par injection de Tris/HCl 50 mM, pH 7,5 à un débit de 30 µl/min.

VIII-1-2-2 - le sensor chip « SA »

L'immobilisation des protéines sur le sensor chip SA nécessite la biotinylation des protéines au préalable. En effet, les chaînes de dextran greffées à la surface du sensor chip « SA » sont pré-immobilisées par de la streptavidine qui a une forte affinité pour la biotine. La biotinylation des OBPp recombinantes est effectuée avec le kit « EZ-link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotinylation » selon les instructions du fournisseur (Pierce). Après activation du sensor chip avec une solution NaCl 1M, NaOH 50 mM, 10 µM de rOBPp dans le tampon HBS-EP (Hépes 10 mM, EDTA 3 mm, NaCl 150 mM, Tween 20 0,005%, pH 7,4) sont injectés à un débit de 5 µl/min. Les protéines non immobilisées sont éliminées par lavages par le tampon HBS, NaCl 1 M. L'interaction de stéroïdes (testostérone, androsténol, Sigma) aux concentrations de 10⁻⁵ et 10⁻⁸ M dans le tampon HBS-EP est testée par injection à un débit de 30 µl/min. Le sensor chip est régénéré après chaque test d'interaction et, en fin d'expérience, avec le tampon HBS-EP pH 5,5.

VIII-1-2-3 - le sensor chip « AU »

L'immobilisation des protéines sur le sensor chip « AU », constitué uniquement d'une fine couche d'or, se fait par adsorption sur la surface. Après lavage dans le tampon HBS-N (Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, pH7,4), la surface du sensor chip est saturée en protéines afin

d'obtenir une monocouche de protéine. Pour cela, plusieurs injections d'OBPp 20 μ M reprises dans le tampon HBS-N ou HBS-EP (HBS, Tween 20 0,005%) sont réalisées à un débit de 5 μ l/min. L'interaction de ces protéines fixées est testée avec des solutions d'androsténol et de testostérone diluées à 10 nM dans le tampon HBS-N ou HBS-EP. La régénération du sensor chip est effectuée après chaque test de liaison par lavages avec le tampon HBS-N, HCl 25 mM.

VIII-1-3 - Analyse des résultats

L'enregistrement du déplacement de l'angle de réflexion est enregistré sous forme de sensorgrammes, quantifiés en RU (response ou resonance units), unité arbitraire proportionnelle à la quantité de molécules fixées à la protéine immobilisée (Figure M-10). Les données sont analysées à l'aide du logiciel « BIAcore 3.0 Evaluation » et ajustés avec le modèle de fixation de Langmuir 1.10.

VIII-2 - Spectroscopie de fluorescence

VIII-2-1 - Mesure des affinités de liaison par compétition avec une sonde fluorescente

La fluorescence d'une protéine est principalement due à la présence de tryptophane dans sa séquence peptidique. La liaison d'un ligand à une protéine n'affectera la fluorescence du(des) tryptophane(s) que si il(s) est(sont) situé(s) au niveau du site de fixation en modifiant son environnement ou en le masquant. Dans le cas de l'OBPb, les résidus tryptophanes sont éloignés du site de liaison. La fixation d'une molécule n'entraîne donc pas ou peu de changement de fluorescence de la protéine. Les mesures d'affinité OBPb-ligands sont réalisées par compétition avec une sonde fluorescente (possédant un signal de fluorescence beaucoup plus intense que celui des tryptophanes intrinsèques de la protéine). La fixation de la sonde dans le(s) site(s) de liaison de la protéine peut être suivie par mesure de la fluorescence. La liaison des ligands avec la protéine déplace la sonde du site de fixation par compétition et induit une diminution de cette fluorescence. Des mesures de fluorescence pour différentes concentrations de ligands permettent alors de déterminer une valeur d'IC₅₀, correspondant à la concentration en ligands nécessaire pour faire diminuer la fluorescence de moitié.

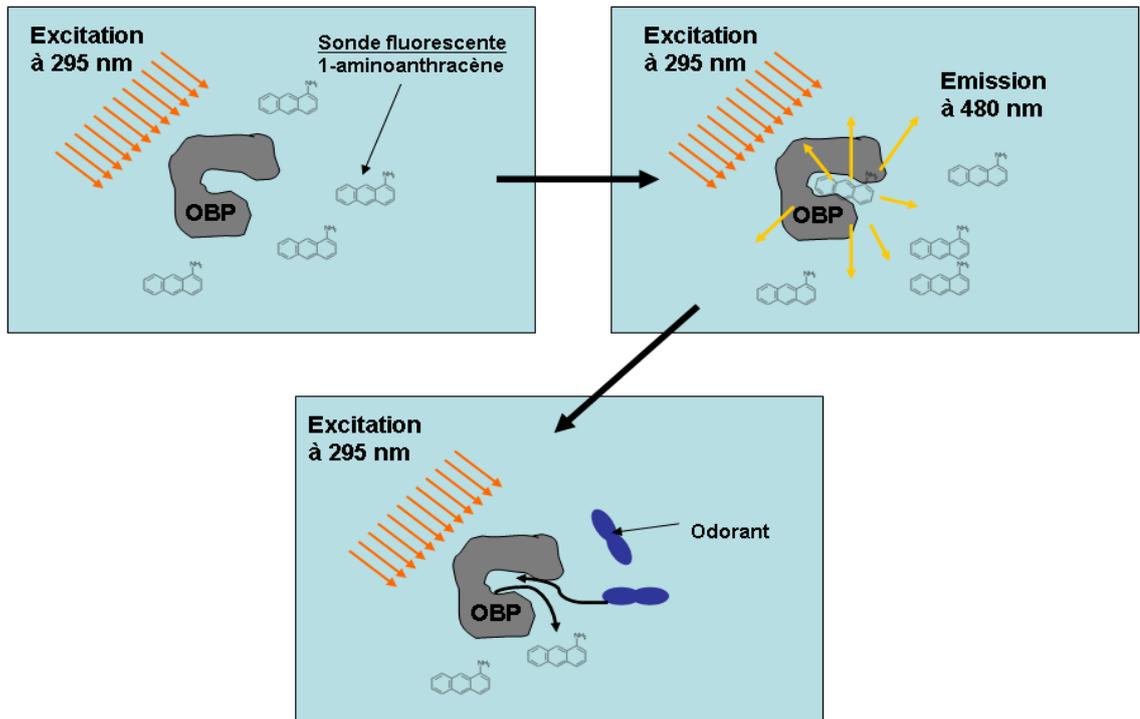


Figure M-11 - Principe de la mesure d'affinité par déplacement de sonde. La sonde fluorescente, ici l'1-aminoanthracène (AMA) émet de la fluorescence à 480 nm quand elle se trouve dans la poche hydrophobe de l'OBPb sous une excitation à 295 nm. En présence du ligand odorant, il y a compétition avec l'AMA pour l'occupation du site de fixation. Une décroissance de fluorescence, qui peut être reliée à l'affinité du ligand pour l'OBPb, est alors observée.

VIII-2-2 - Fixation de la sonde AMA

Les expérimentations de spectroscopie de fluorescence sont réalisées dans des cuves en quartz contenant 1 ml de protéine à 0,6 ou 0,8 μM dans un tampon Tris/HCl 50 mM, pH 7,5. Les concentrations protéiques sont déterminées par spectroscopie UV/visible à l'aide du coefficient molaire d'extinction du dimère de l'OBPb $47000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ramoni *et al.*, 2001). La sonde fluorescente utilisée est l'1-aminoanthracène (AMA), utilisée classiquement dans les études de fluorescence mettant en jeu les OBP. L'AMA est préparé dans 100% d'éthanol à une concentration de 1 mM. Des ajouts successifs de 1 μl à partir de cette solution sont effectués dans la solution protéique. Les spectres sont enregistrés à 22°C avec un spectrofluorimètre Fluoromax-3 (Jobin-Yvon). Après un temps d'incubation de 10 min, permettant d'atteindre un équilibre, toutes les solutions protéiques additionnées d'AMA sont excitées successivement à 295 nm et à 380 nm. Ces deux longueurs d'ondes correspondent respectivement à la bande d'adsorption des tryptophanes protéiques et à celle de l'AMA. L'acquisition des spectres d'émission se fait sans polariseurs et une bande passante de 5 nm à l'excitation et à l'émission lors d'une excitation à 295 nm, tandis que celle à 380 nm se fait avec polariseurs et une bande passante de 2,5 nm. De façon à limiter le ratio signal/bruit de fond, les spectres sont enregistrés 3 fois et moyennés. Les constantes de dissociation (K_{diss}) OBP-AMA sont calculées à partir de la courbe de titration avec le logiciel Origin 7.5 (Originlab corporation, Northampton, MA, USA). Les décompositions de spectre, permettant de normaliser les spectres par rapport au Raman, sont réalisées avec le logiciel NGS LabSpec à partir des spectres convertis en nombre d'onde.

VIII-2-3 - Mesure de l'affinité de la protéine pour des ligands

Les déplacements de sonde fluorescente sont réalisés à partir de solutions d'OBP natives à 0,4 μM (concentration du dimère) avec 1,2 μM d'AMA. Les molécules odorantes testées sont préparées dans 100% d'éthanol à une concentration finale de 1 mM et ajoutées par fractions de 1 μl . Après chaque ajout, le mélange est incubé à l'obscurité pendant 10 min avant enregistrement des spectres de façon identique à ce qui a été décrit dans le paragraphe précédent.

Il s'agit d'une compétition qui permet de déterminer expérimentalement la valeur de l'IC50 qui correspond à la concentration en compétiteur induisant une diminution de la moitié de la fluorescence pour l'AMA. Les K_{diss} sont calculées par la formule suivante

$K_{\text{diss}} = IC50 / (1 + [S]/K_d)$ avec [S] la concentration en sonde totale et K_d la constante de dissociation du complexe sonde-protéine.

IX - Caractérisation des ligands naturels des protéines

IX-1 - Extraction des ligands naturels

L'extraction du ligand naturel est réalisée à partir d'un gel de polyacrylamide natif (cf. paragraphe III-3) de 1,5 mm d'épaisseur, coloré au Bleu de Coomassie colloïdal, sur lequel les bandes protéiques d'intérêt sont découpées à peine colorées. La nature des protéines est vérifiée par spectrométrie de masse MALDI-TOF à partir d'un gel « jumeau » ayant migré en même temps que le gel découpé. Les bandes protéiques sont broyées à l'aide d'un piston dans 1 ml de chloroforme/méthanol (2 /1, v/v) à température ambiante et la phase liquide est séchée au Speedvac. Les échantillons ainsi obtenus sont repris dans de l'acétonitrile sec pour être analysés par GC/MS ou dérivés dans une solution d'acétonitrile contenant de l'acide hexafluorobutyrique par chauffage à 150°C pendant 1 min. Après évaporation sous azote, les échantillons dérivés sont repris dans 50 µl d'acétonitrile sec pour être analysés par GC/MS.

IX-2 - Analyse des ligands extraits par GC/MS

Les analyses par GC/MS sont effectuées sur un appareil constitué d'un GC Focus équipé d'une colonne capillaire de phase inverse CP-sil5 CB Low Bleed/MS (25 m x 0.32 mm x 0.25 µm). La température de l'injecteur en mode split/splitless est de 260°C. Le programme d'analyse de l'échantillon est le suivant : 90°C pendant 3 min à 5°C/min jusqu'à 260°C, maintenu pendant 20 min. La colonne est couplée à un détecteur de masse (DSQII, Thermo). L'ionisation est obtenue par impact électronique à 70 eV avec une température de source de 180°C. L'interprétation des spectres est réalisée avec le logiciel NIST.

Annexes

Annexe 1 – Suivi des cycles de la collecte « Châteauvillain 1 »

Annexe 2 – Suivi des cycles de la collecte « Châteauvillain 2 »

Annexe 3 – Suivi des cycles de la collecte « Châteauvillain 3 »

Annexe 4 – Cartographie peptidique des OBPb purifiées à partir des MR

Annexe 5 – Cartographie peptidique des OBPb purifiées à partir des MN

Annexe 1

Suivi des cycles oestriques des vaches de la collecte

« Châteauvillain 1 » -Mai 2007

Dosages hormonaux

Observations comportementales et physiologiques

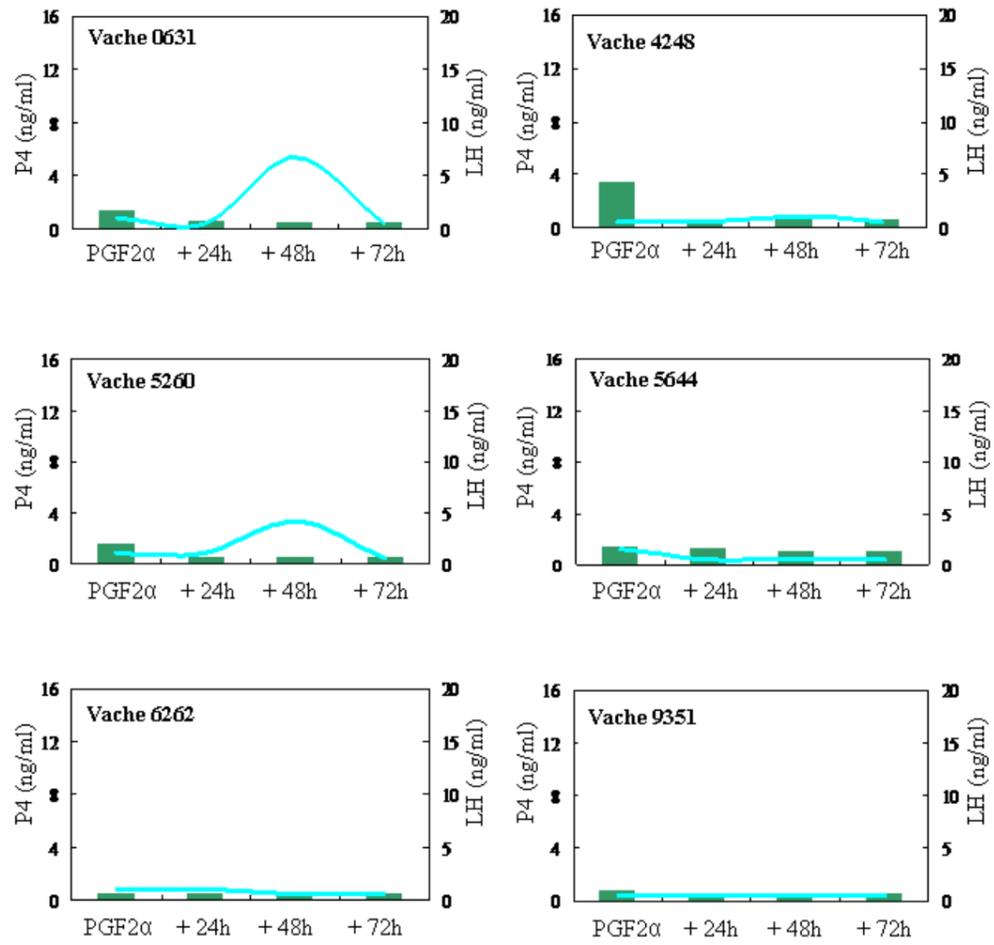


Figure A1-1 - Dosages hormonaux plasmatiques réalisés sur les vaches de la collecte « Châteauvillain 1 » - P4 = Progesterone, LH = Hormone Lutéinisante, PGF2 = 2nde injection de PGF2α, + Xh = heures post-injection de PGF2α.

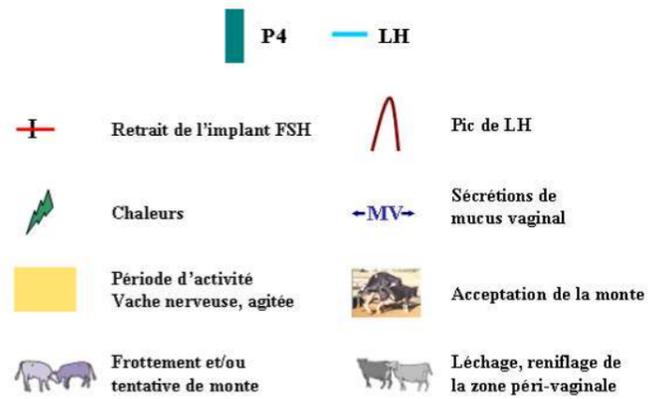


Figure A1-2 - Schéma récapitulatif des comportements observés lors de collecte « Châteauvillain 1 »

Annexe 2

Suivi des cycles oestriques des vaches de la collecte

« Châteauvillain 2 » - Octobre 2007

Dosages hormonaux

Observations comportementales et physiologiques

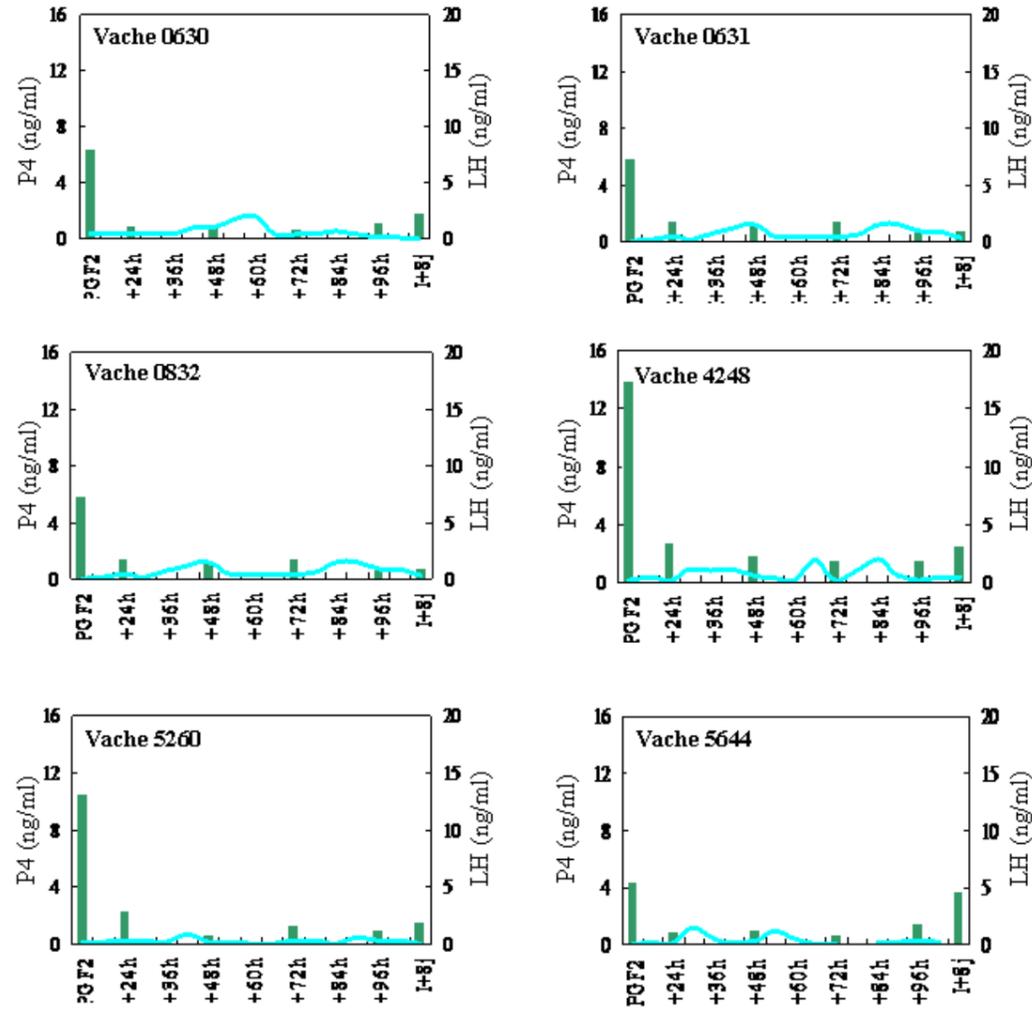


Figure A2-1 - Dosages hormonaux plasmatiques réalisés sur les vaches de la collecte « Châteauvillain 2 » - P4 = Progesterone, LH = Hormone Lutéinisante, PGF2 = 2nde injection de PGF2α, + Xh = heures post-injection de PGF2α.

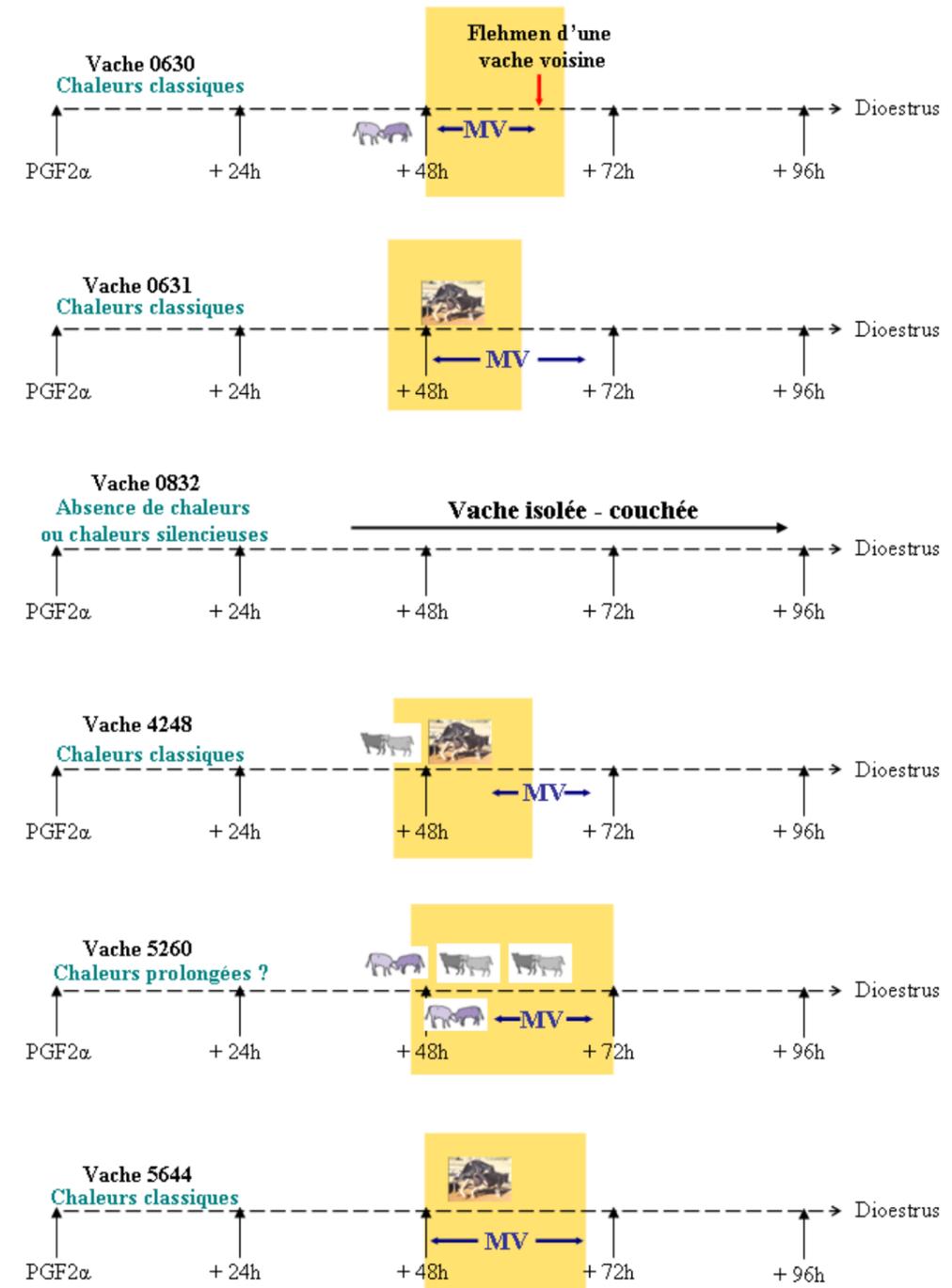
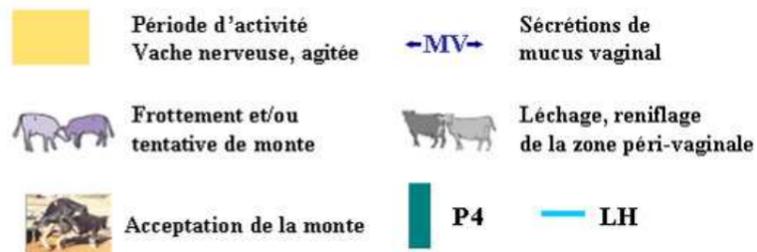


Figure A2-2 - Schéma récapitulatif des comportements observés lors de collecte « Châteauvillain 2 »

Annexe 3

Suivi des cycles oestriques des vaches de la collecte

« Châteauvillain 3 » - Avril 2008

Dosages hormonaux

Observations comportementales et physiologiques

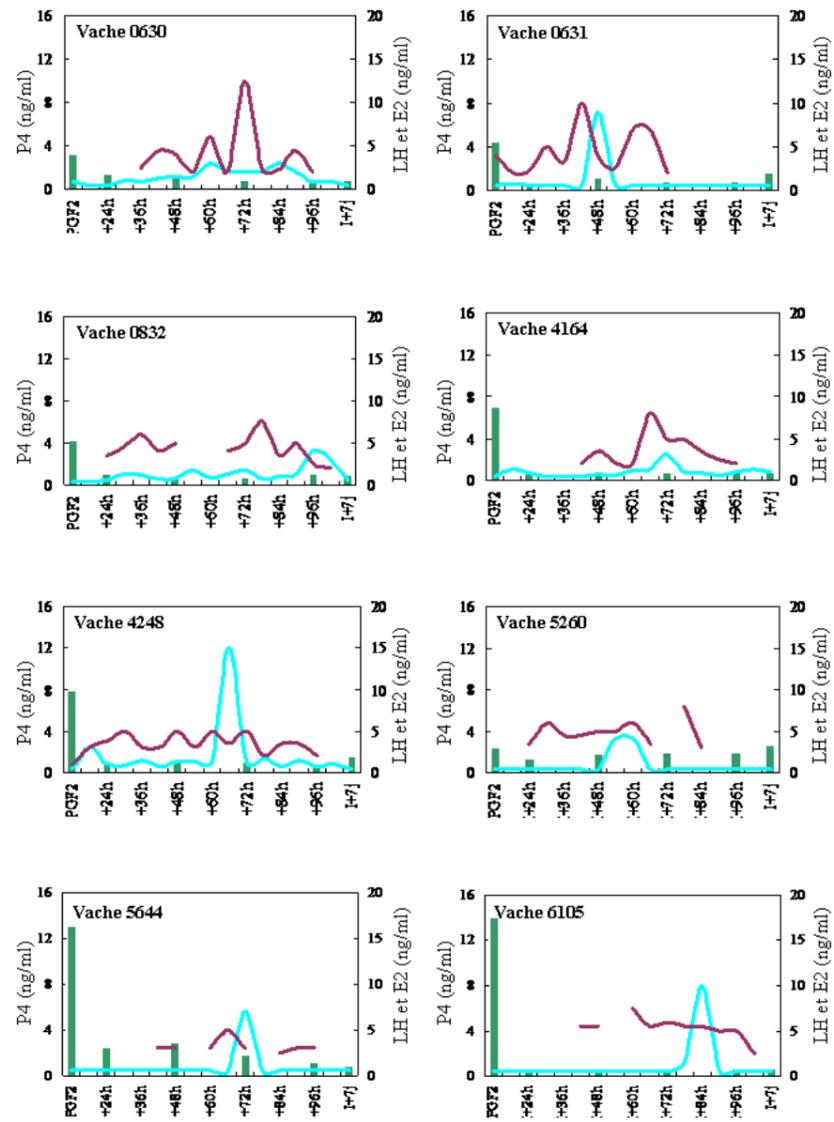


Figure A3-1 - Dosages hormonaux plasmatiques réalisés sur les vaches de la collecte « Châteauvillain 3 » - P4 = Progestérone, LH = Hormone Lutéinisante, E2 = oestradiol, PGF2 = 2nde injection de PGF2 α , + Xh = heures post-injection de PGF2 α .

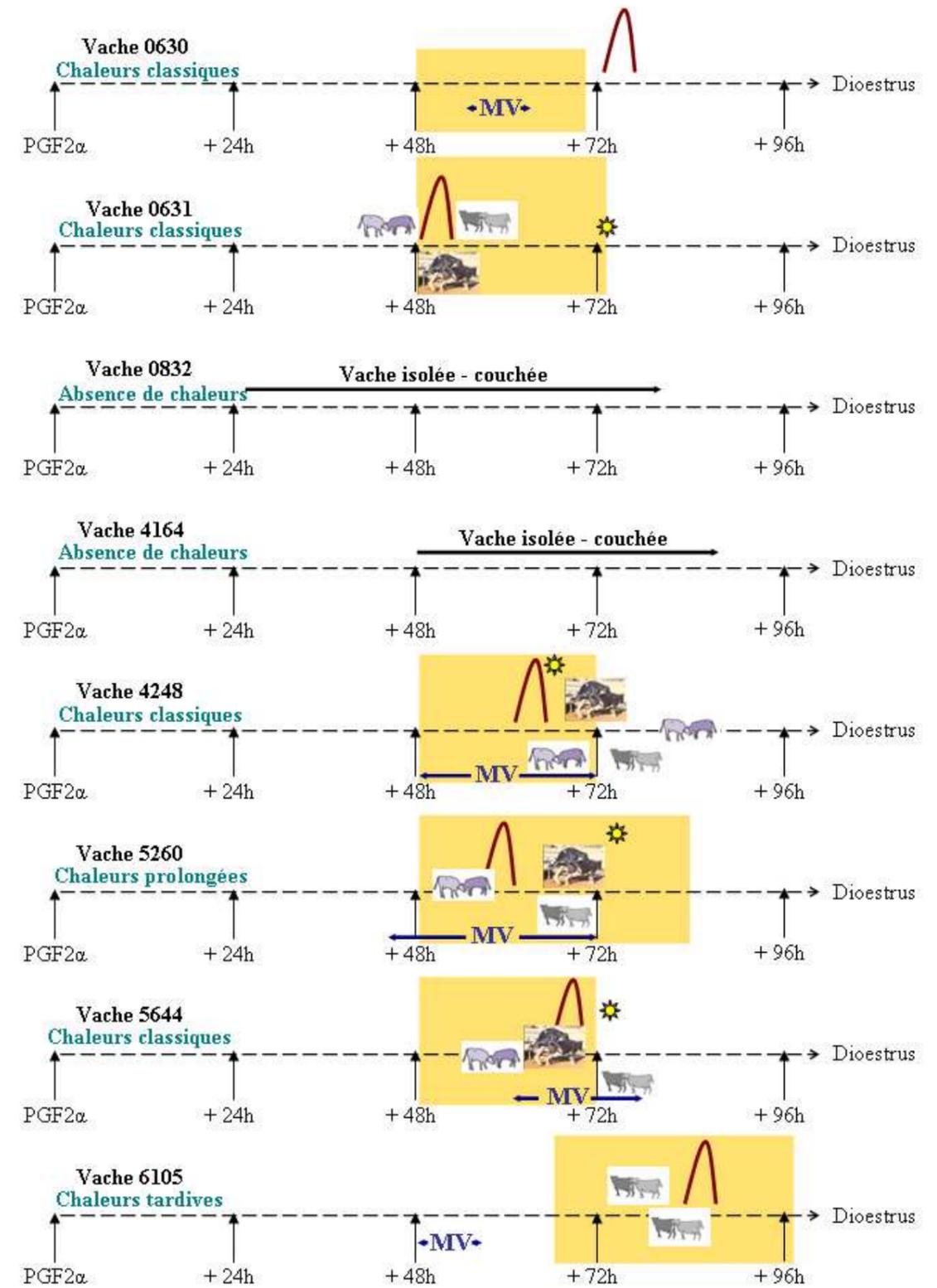


Figure A3-2 - Schéma récapitulatif des comportements observés lors de collecte « Châteauvillain 3 »

OBPb purifiées à partir des Muqueuses Respiratoires Mâle				
Peptide	Masse Théorique	Masse Expérimentale		
		Fraction 3	Fraction 4	Fraction 5
19-37	2150,0876	2149,8465	2150,4115	2150,5396
38-41	586,2984	586,2540	586,2298	586,2345
71-90	2249,0356	2248,9704		2248,9660
74-90	1948,8559	1948,6030	1948,4391	1948,5757
91-96	674,4195	674,3570		
91-108	2016,1348	2016,6386	2016,4464	2016,3965
97-112	1810,9670		1810,5786	1811,0635
122-134	1664,8166	1664,6151	1664,4666	1664,4232
145-159	1789,8140	1789,6200	1789,4427	1789,3778
Recouvrement de la séquence de l'OBPb		55,97 %	56,60 %	58,49 %

OBPb purifiées à partir des Muqueuses Respiratoires Femelle			
Peptide	Masse Théorique	Masse Expérimentale	
		Fraction 3	Fraction 4
19-37	2150,0876	2150,5839	2150,0207
38-41	586,2984	586,3481	586,211628
42-60	2294,1339	2294,2681	
50-63	1618,8223	1619,0903	
64-73	1210,7055		1210,5157
66-70	596,3514	596,3919	
91-96	674,4195	674,4863	674,3305
91-108	2016,1348		2016,5922
97-112	1810,9670		1811,2886
135-139	605,3141		605,1185
145-159	1789,8140	1790,2448	1789,7402
Recouvrement de la séquence de l'OBPb		41,51 %	59,12 %

Annexe 4 - Cartographie peptidique des fractions purifiées d'OBPb à partir des MR mâle et femelle

OBPb purifiées à partir des Muqueuses Nasaux Mâle				
Peptide	Masse Théorique	Masse Expérimentale		
		Fraction 3	Fraction 4	Fraction 5
19-37	2150,0876	2150,3457	2150,4560	2149,9821
30-37	960,4897	960,5632	960,7843	960,5234
66-70	596,3514	596,8830	596,6320	596,6732
71-90	2249,0356		2249,4589	2249,2187
74-90	1948,8559		1949,0847	
91-96	674,4195			674,5870
91-108	2016,1348	2015,9687		
122-134	1664,8166	1664,9987	1664,8873	1664,6709
145-159	1789,8140	1789,9980	1789,8732	1789,7056
Recouvrement de la séquence de l'OBPb		43,39 %	44,65 %	48,42 %

OBPb purifiées à partir des Mucus Nasaux Femelle				
Peptide	Masse Théorique	Masse Expérimentale		
		Fraction 5	Fraction 7	Fraction 8
19-41	2717,3681		2717,0872	2717,0417
42-60	2294,1339	2294,087314		
61-70	1210,6691	1210,46199	1210,4011	1210,9855
71-96	2904,4373	2904,1227		
97-112	1810,9670	1810,9528	1810,6092	1810,1957
97-121	2799,5264		2798,2048	2798,3176
122-134	1664,8166	1664,4254	1664,9771	1664,9756
145-159	1789,8140	1789,9721	1789,9267	1789,9135
Recouvrement de la séquence de l'OBPb		62,26 %	54,08 %	54,08 %

Annexe 5 - Cartographie peptidique des fractions purifiées d'OBPb à partir des MN mâle et femelle

Publications

Nagnan-Le Meillour PN, Lagant P, Cornard JP, Brimau F, **Le Danvic C**, Vergoten G & Michalski JC (2009a) *Phenylalanine 35 and tyrosine 82 are involved in the uptake and release of ligand by porcine odorant-binding protein*, *Biochim Biophys Acta*, 1794(8), 1142-1150.

Le Danvic C, Guiraudie-Capraz G, Abderrahmani D, Zanetta JP & Nagnan-Le Meillour P (2009) *Natural Ligands of Porcine Olfactory Binding Proteins*, *J Chem Ecol.*,35(7), 741-751.

Nagnan-Le Meillour P, **Le Danvic C**, Brimau F, Chemineau P & Michalski JC (2009b) *Phosphorylation of Native Porcine Olfactory Binding Proteins*, *J Chem Ecol.*, 35(7), 752-760.



Phenylalanine 35 and tyrosine 82 are involved in the uptake and release of ligand by porcine odorant-binding protein

Patricia Nagnan-Le Meillour^{a,*}, Philippe Lagant^b, Jean-Paul Cornard^c, Fanny Brimau^a,
Chrystelle Le Danvic^{a,d}, Gérard Vergoten^b, Jean-Claude Michalski^b

^a INRA, UMR 8576 CNRS/USTL, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Bâtiment C9, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

^b CNRS, UMR 8576 CNRS/USTL, UGSF, Villeneuve d'Ascq, France

^c USTL, UMR 8516 CNRS/USTL, LASIR, Villeneuve d'Ascq, France

^d UNCEIA, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2008

Received in revised form 7 April 2009

Accepted 15 April 2009

Available online 3 May 2009

Keywords:

Porcine odorant-binding protein

Molecular dynamics

Heterologous expression

Pichia pastoris

Fluorescence spectroscopy

1-aminoanthracene

ABSTRACT

Structural and molecular dynamics studies have pointed out the role of aromatic residues in the uptake of ligand by porcine odorant-binding protein (pOBP). The shift of Tyr82 from its position during the opening of the binding cavity has been shown, and was supposed to participate in the entrance of the ligand. Several Phe residues in the vicinity of Tyr82 could also participate in the binding process. To clarify their involvement, we performed molecular dynamics studies to simulate the dissociation of undecanal, a ligand previously co-crystallized with pOBP. The results confirmed the key-role of Tyr82 and pointed out the participation of Phe35 in controlling the reorientation of undecanal towards the exit. To bring experimental support to both published (binding) and present simulations (dissociation), we have mutated these two residues and over expressed the wild type pOBP, the two single mutants and the double mutant in the yeast *Pichia pastoris*. As fluorescence spectroscopy implies the uptake of the fluorescent probe and release in displacement experiments, we monitored the binding ability of the four proteins for 1-aminoanthracene (1-AMA). The experimental results indicated that both residues are involved in the uptake of ligand as the three mutated proteins were unable to bind 1-AMA, contrary to the wild type recombinant pOBP that bound 1-AMA with the expected affinity.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Olfactory-binding proteins are small soluble proteins secreted by exocrine glands in various fluids and mucus of vertebrates (urine, nasal mucus, vaginal secretions). They belong to the lipocalin family (for a review see [1]). They are involved in the binding of numerous hydrophobic ligands with affinity in the micromolar range. Some of them, called pheromone-binding proteins (e.g. MUPs in rodents, SAL in pig, Aphrodisin in hamster) are clearly involved in vertebrate chemical communication, binding with high specificity sex pheromone components. On the contrary, the sub-class of Odorant-Binding Proteins (OBPs) has the ability to bind a wide range of ligands, without apparent specificity [2]. Several roles have been hypothesized for OBPs expressed in the nasal area [3]. They could act as passive transporters of hydrophobic and volatile ligands, particularly odours, through the hydrophilic mucus layer [4]. Other roles have been suggested, scavengers to prevent the saturation of olfactory receptors, deactivation of odours, principally based on their poor binding specificity and

on the few number of OBPs identified in each species. Alternatively, OBPs bound to odourants might interact with olfactory receptors to induce the olfactory transduction cascade. This supposes conformational changes of the protein upon ligand binding, which could allow receptor recognition [5]. Interaction between porcine OBP (pOBP) and human olfactory receptor OR17-210 has been evidenced but with unbound pOBP, devoid of ligand [6,7].

Extensive studies on pOBP binding properties were performed to characterise any conformational change or different affinities for ligands of different chemical structures to support this hypothesis. pOBP purified from pig nasal mucus is a monomer of 157 amino acids [8,9] containing one disulfide bridge between cysteines at positions 63 and 155. Alternatively, Burova et al. [10] showed that pOBP, such as another lipocalin, the bovine β -lactoglobuline, is dimeric at physiological pH (7.2) and monomeric at acidic pH. Dimerization of aphrodisin at neutral pH was also reported [11]. Porcine OBP structure has been solved by X-ray crystallography [12] and two molecules of pOBP were found in the crystal, associated by weak hydrophobic interactions. The internal hydrophobic cavity, inside the β -barrel of the two identical monomers, is lined by eighteen residues, mainly hydrophobic and aromatic, which are well conserved between species [12]. The two monomers contact each other face to back and are tilted

* Corresponding author. Tel.: +33 3 20 43 40 10; fax: +33 3 20 43 65 55.
E-mail address: patricia.le-meillour@univ-lille1.fr (P. Nagnan-Le Meillour).

at an angle of roughly 90° along an axis which is perpendicular to the axis of the β -barrel. The authors found also that the surface area of the dimer interface accounts for only 2.6% of the total area of the dimer [12], a result indicating that the monomer contacts are not sufficiently important to maintain high dimer stability. Contrary to bovine OBP [13], the natural ligand of which was characterised, attempts to characterise any endogenous ligand of pOBP were unsuccessful. Previous molecular dynamics studies have shown that the binding cavity is shielded from the solvent and indicated that openings are triggered by shifts of residues considered to take part in the door of the cavity, especially tyrosine 82 [14,15], but the participation of other residues, mainly aromatics (Phe35, Phe55 and Phe66) or Pro34 is less clear.

Knowledge of the particular residues involved into possible dissociation pathways of a hydrophobic ligand such as undecanal (UND) from the cavity of the pOBP can lead to a better understanding of the ligand binding process. In this work, we performed molecular dynamics (MD) studies on the pOBP–UND complex to simulate the ligand dissociation. Based on the crystal structure of pOBP [16], we identified two potential key residues, which might determine the accessibility of the binding cavity to the ligand. We mutated these key residues and over expressed recombinant wild type pOBP and its three mutants (pOBP-F35A, pOBP-Y82A and pOBP-F35A/Y82A) in the yeast *Pichia pastoris*. The binding properties of the four proteins were studied by fluorescence spectroscopy with the commonly used fluorescent probe 1-aminoanthracene (AMA).

2. Materials and methods

2.1. Molecular dynamics studies

The starting conformation of the complex was taken from the crystal structure obtained by Vincent et al. [16] (PDB identifier 1E02). Hydrogen atoms were added using the Sybyl software (Tripos Inc., Saint-Louis, MO, USA) to obtain a neutral form of the protein. Along dynamical studies, only the monomer involving the A chain with its associated co-crystallized undecanal ligand (UND) was taken into consideration. The hydrophobic character of the ligand originates in the presence of a linear alkane chain ending with a terminal aldehyde group ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_9-\text{CH}=\text{O}$). The atomic positions for the first eight residues of the N-terminal part (GenBank accession number AF436848) and the last C-terminal one (Lys158), not available from the crystal structure, were obtained from constrained Monte Carlo type calculations, keeping the Cartesian coordinates of residues 9 to 157 unchanged. Examination of the relative positions of the co-crystallized water molecules (between 120 (A chain) and 82 (B chain)) has confirmed that none of them could be present inside the internal binding pocket.

At first, the complex was minimized using the CHARMM program (version c30b2) [17,18] using the modified Urey–Bradley type force field SPASIBA [19–21] for the non-aromatic residues. Parameters and charges related to the UND ligand were obtained from previous studies on alkanes and aldehydes [22,23] while atomic partial charges and non-bonded parameters for the amino acid residues were taken directly from the charmm-27 parameter set. Minimization of the starting configuration was achieved after 2000 steps of steepest descent to reach a root mean square deviation of 0.05 in the gradient of energy (GRMS). Some changes in the overall pOBP geometry could then be detected with the occurrence of a large destabilization in the B strand (residues 37–45 in the crystal state) and the appearance of a slight bending of the terminal α -helix. The dynamical studies were performed onto the pOBP–UND complex in the NVT ensemble using the Verlet leapfrog algorithm with non-bonded (vswitch) and electrostatic (shift) types of cut off (14 Å). All dynamical trajectories were obtained using the all atom model (no SHAKE constraints on hydrogen atoms) with a 0.5-fs time-step and recording the atomic

positions every 200 steps (0.1 ps). Two different simulations were carried on the pOBP–UND complex as described below. In each case, a 250-ps trajectory was preliminary performed for the heating and equilibration phases leading to a final temperature of 300 °K. The attempts to use implicit solvent models to simulate surrounding effects on the pOBP–UND complex by using dielectric constants of 4 (non-polar medium) and 80 (water) led to a fast unfolding of the pOBP. The present calculations were then carried out in a first approximation under a dielectric constant of 1 (vacuum), as no molecule of water could be detected in the binding pocket [14] and as preliminary dynamical studies (not exposed here) have shown a large overall structure conservation of the β -barrels and helical structures in absence of external water.

2.2. Proteins production and purification

2.2.1. cDNA clone isolation of porcine OBP and construction of the expression vector

The cDNA sequence encoding pOBP (GenBank accession number AF436848) was isolated from a previous construction obtained by Guiraudie et al. [24], with the following primers: sense 5'-GCGCCCTACGTAATGAAGACTCTGCTGCTGAGTCTG-3' and antisense 5'-TTAATTGCGGCCGCTCACTTGGCAGGACAGTCATC-3'. These primers contained SnaBI (sense, bold) and NotI (antisense, bold) restriction sites, together with the natural signal peptide sequence (sense, underlined). PCR amplifications were carried out on a Thermal Cycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) with 150 ng of cDNA in a solution containing 1.25 U of Hot Start Proofreading DNA polymerase (Accu Prime™ Pfx, Invitrogen), 0.3 μM of each PCR primer, 1 \times of DNA polymerase manufacturer's buffer containing dNTP in a final volume of 50 μL . The reaction cycles were performed as follows: 95 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 1 min at 68 °C. A single PCR product was obtained and ligated into SnaBI and NotI restriction sites of the pPIC3.5K vector with T4 DNA Ligase (Invitrogen) according to the instructions of the Multi-Copy Pichia Expression Kit manual (Invitrogen). The plasmid DNA *pOBP/pPIC3.5K* was amplified into *Escherichia coli* Top10F' chemically competent cells (Invitrogen). Cloning steps were verified by both strands DNA sequencing (MWG Biotech).

2.2.2. Site-directed mutagenesis

For simplicity, the one-letter code was used for the name of pOBP mutants (*plasmids* and *proteins*). *pOBP-F35A/Y82A* double mutant cDNA was generated from the plasmid *pOBP/pPIC3.5K* using the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene) according to the manufacturer's protocol. A first mutagenesis step using the following primers generated the *pOBP-F35A/pPIC3.5K* mutant: sense 5'-GGAGAAAATGCACCCGCCAGGTTTTCATGCGTAGC-3' and antisense 5'-GCTACGCATGAAAACCTGGGCGGGTGCATTTTCTCC-3'. The double mutant *pOBP-F35A/Y82A/pPIC3.5K* was obtained using the *pOBP-F35A/pPIC3.5K* plasmid as template and the following couple of primers: sense 5'-GGCAATACTTACGATGTTAACCGCGAGGTAACAA-CAAATTTG-3' and antisense 5'-CAAATTTGTTGTACCTGCGCGGTTAA-CATCGTAAGTATTGCC-3'. The other single mutant *pOBP-Y82/pPIC3.5K* was obtained using the same couple of primers in the PCR reaction with the *pOBP/pPIC3.5K* plasmid as template. PCR reactions were carried out on a Thermal Cycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) with 20 ng of plasmid cDNA in a solution containing 2.5 U of *PfuUltra* HF DNA polymerase (Stratagene), 0.3 μM of each PCR primer, 3 μL of QuickSolution and 1 μL of dNTP mix in a final volume of 50 μL . The reaction cycles were performed as follows: 95 °C for 1 min, followed by 18 cycles of 50 s at 95 °C, 50 s at 60 °C and 11 min at 68 °C, and one final extension step of 7 min at 68 °C. The three plasmids were amplified in *E. coli* XL10-Gold supplied in the mutagenesis kit. Cloning steps were controlled by DNA sequencing in both senses (MWG Biotech).

2.2.3. Transformation of *P. pastoris* strain and screening for protein expression

Recombinant plasmids obtained above were linearized with *Sac*I and used to transform GS115 *P. pastoris* strain by electroporation according to the method described in the manufacturer's manual (Invitrogen). Selection of His⁺/Mut⁺ transformants was achieved as previously described [7]. The recombinant clones were screened on YPD agar plates containing growing doses of G418 (Geneticin, Invitrogen) for the presence of multiple inserts. Twenty selected clones for each construction were grown in 10 mL BMGY medium at 29 °C during 48 h. Cells were pelleted by centrifugation (2000 rpm, 2 min, room temperature (RT)) and resuspended in 2 mL of BMM medium. After 48 h, the cultures were centrifuged (13,000 rpm, 10 min, 4 °C), and 200 µL of the supernatant was dried under vacuum and analysed by both native- and SDS-PAGE for their protein content. The best producing clone for each construction was used for 200 mL cultures as described in [7].

2.2.4. Purification of recombinant proteins

After a three day culture, the expression medium was centrifuged at 3500 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was concentrated to 20 mL by centrifugation in Vivaspin 20 (3000 MWCO, Sartorius), then extensively dialysed against water. The supernatant was diluted in buffer A (50 mM Tris HCl pH 7.8) and loaded onto a Mono Q 5/50 GL column (Pharmacia). The proteins were purified by anion exchange FPLC using a linear gradient of NaCl (buffer B, 50 mM Tris HCl pH 7.8, NaCl 0.5 M). The eluted fractions were checked by SDS-PAGE as below. The fraction containing the recombinant protein was extensively dialysed against water, dried under vacuum and stored at –20 °C.

2.2.5. Characterisation of recombinant proteins by in-gel digest, peptide extraction and MALDI-TOF MS analysis

Recombinant proteins were analysed by 16.8% PAGE gels either in native or denaturing and reducing conditions as previously described [24]. For coloration, gels were stained overnight in Coomassie blue R solution as described [24]. The band slices containing the proteins of interest were treated as described in [25]. The resulting peptides were extracted with two incubations in ACN 45% in 10% formic acid at 30 °C for 15 min, followed by incubation in ACN 95% in 5% formic acid at RT for 15 min. The extracts were dried under vacuum and solubilised in 5 µL of TFA 0.1% before desalting and concentration on a C18 column (Vivapure C18, microspin columns, Sartorius). Peptides were directly eluted in the matrix (4-hydroxy- α -cyanocinnamic acid, Sigma-Aldrich) prepared at a concentration of 10 mg/mL in different concentrations of ACN (12.5%, 25%, 50%, 60%, 80%) in 0.1% TFA and analysed on a Voyager DE Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems). The instrument was used in reflector mode, measuring peptide masses in a range of 500 to 4000 Da. Calibration points were based on the masses of the matrix cluster or trypsin autolysis products. Protein identification was performed by comparison of measured peptide masses with the theoretical maps of pOBP and its mutants (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

2.3. Fluorescence studies

The fluorescent probe 1-aminoanthracene (AMA) was purchased from Sigma-Aldrich. UV-visible spectra were carried out on a double beam spectrometer (Cary 100 – Varian) using cell of 1 cm path length. Fluorescence measurements were performed on a Fluoromax-3 (Jobin-Yvon) spectrofluorimeter at 22 °C with 0.5 cm light-path quartz cell. The steady-state fluorescence spectra were recorded at 0.5 nm intervals with an integration time of 1 s. The absorbance solution was <0.1 at the excitation wavelength, to avoid inner filter effects. The protein concentration was calculated by UV-visible spectroscopy, using the molar extinction coefficient of 11,740,

13,075, 11,585 and 11,585 M⁻¹ cm⁻¹ (calculated by the software “ProtParam tool” at www.expasy.org for pOBP, pOBP-F35A, pOBP-Y82A, pOBP-F35A/Y82A, respectively) at the maximum of absorption (280 nm). The fluorescent probe was dissolved in ethanol 100% as 1 mM solutions. Aliquots of AMA were successively added to the protein solution containing 50 mM Tris buffer (pH 7.8) and emission spectra were acquired after a 15 min equilibration period. All the solutions were successively excited at two wavelengths: 295 and 375 nm. 295 nm corresponds to the protein absorption band, where the absorption of the Trp16 residue is much higher than that of tyrosines [26], whereas 375 nm corresponds to the AMA absorption. Emission spectra were recorded with and without Glan–Thompson polarizers in the excitation and detection channels. Slits width of 5 nm for both excitation and emission monochromators were adopted when using polarizers and 2.5 nm without polarizer. The spectra were recorded 3 times and averaged to increase the signal-to-noise ratio. The dissociation constant (K_d) of the pOBP–AMA complex was calculated from the binding curve by fitting the experimental data with the use of the computer program Origin 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA – USA). The spectral decomposition of the fluorescence spectra was achieved with the LabSpec 5.21 software (Jobin-Yvon). This decomposition was carried out after a conversion of the spectra into wavenumbers.

3. Results and discussion

3.1. Molecular dynamics studies

A first MD calculation on the pOBP–UND complex was performed using the parameter sets (par/top-all27.prot) and the current analytical potential energy expression with related atomic charges available from the CHARMM program for a 10 ns trajectory using a 0.5 fs time-step and recording Cartesian coordinates every 200 time-steps (0.1 ps). A plot of the distance between mass centres of the pOBP and UND could not demonstrate any change in their relative positions, the mean value remaining stable between 3 and 5 Å all the trajectory long. No other significant secondary structural modifications (when compared to the final minimized structure) of the protein could be observed in the β -sheet strands or helix parts of the pOBP along the complete dynamical run.

Another MD approach was attempted via the use of the SPASIBA force field included in CHARMM [19–21] for a 8 ns trajectory under the same physical conditions as before. In the first 1–2 ns of dynamics, one can observe relative changes in the distances between the pOBP and UND mass centres from 4 to 6 Å followed by a “reabsorption” of the ligand inside the pOBP. After 6 ns of dynamics the distance between the two mass centres increased to 7 Å and remained constant until the end of the simulation. Graphical examinations of the various conformers versus time revealed a strong perturbation in the unbinding process brought by the presence of the two aromatic residues, Phe35 and Tyr82 (and in a less extent Phe55) located at the border of the binding pocket and acting as a key lock preventing a complete exit of the ligand.

In an attempt to observe a neat exclusion of the ligand from the binding pocket, the initial values of the side chains dihedral angles (expressed in degrees) of these two residues were arbitrarily modified from their crystal values to make way to the ligand. For Phe35, the dihedral values of the side chain angles obtained preliminary from minimization in the presence of the UND ligand χ_1^{NCACBCG} (183) and $\chi_2^{\text{CACBCGCD1}}$, $\chi_2^{\text{CACBCGCD2}}$ (226, 50.3) were modified to 105, 225 and 57 degrees, to help the dissociation process. For Tyr82, the corresponding dihedral values were modified from 180 (47, 217) to 81 (41, –140). These artificial changes could be justified by the need of computational savings, as the time required to obtain correct torsional values for an easy dissociation could be very expensive, and in the same way, to prevent the stability brought by the relative mutual side chain

orientations that could be adopted by these two aromatic residues when exposed to an aqueous external solvent.

A new run including these modifications was then performed with identical heating and equilibrating periods as before for a total run of 3.3 ns. Exclusion of the ligand from the binding pocket can be predicted from the fast increase in the distance between the two centres of mass from 6 to 14 Å, leading to a final stabilization around 12 Å, indicating an incomplete release of the ligand with its aldehyde group pointing directly out of the binding pocket (Fig. 1a–d). Interestingly, after a few picoseconds of dynamics (heating period), new changes in the Phe35 side chain dihedral values occurred, leading to stable mean values ($\pm 15^\circ$) spreading over the -156 (χ_1) and 52 , -121 (χ_2) range, all molecular dynamics long. In opposite, the side chain dihedral values for Tyr82 remained stable in the range of the modified values all along the dynamical run. Analysis of the first steps of MD (50–60 ps) revealed fast rearrangements in the relative position of UND with the appearance of a large bending in the chain, leading to a complete reorientation of the ligand perpendicular to its native orientation (Fig. 1c). The important role of Phe35 and Phe88 aromatic residues should be noticed together with the contribution (in the first steps of exclusion) of the two flanking neutral amino acids Ile100 and Leu68 to the hydrophobic interactions with the UND ligand. The hydrogen atom of the amide group of Gln86 forms a transitive hydrogen bond with the carbonyl oxygen of the ligand aldehyde

group. The stability in the Phe35 side chain dihedral angles values (after their predicted fast change during the heating period) keeping the same planar ring orientation led to two simultaneous features, i.e. in a first hand, the bending of the ligand at this level and in a second hand, to the orientation of the chain in a direction parallel to the median axis between the strands D and E.

Examinations of the sequences related to the secondary structures obtained for each conformer extracted from the 0–3.3 ns dynamics run revealed transient disappearances of the secondary structure of the β -B strand (residues 40 to 45 in the crystal state [16]), this being replaced by a loop following the preceding helical and random structures (residues 25 to 35) corresponding to the Ω -loop as discussed by Mazzini et al. [27]. As a consequence, and in a crude approximation, the distance between the C_α atoms of the first residue of strand B (Val37) and the last one in strand C (Glu59) moved from 11.2 (crystal data) to a mean value of 14.6 Å during the dynamics. The distance between the two central and facing each other residues Ser41 (strand B) and Asn54 (strand C) increased quickly from 5.2 Å (crystal state) to a mean value of 8.8 Å while keeping their relative positions. While all other β -strands remained in a major part unchanged over the dynamical run (see below), some distortions in the pure α -helical structures (residues 124 to 139) could be observed along the dynamical steps with minor consequences on the hinge loop linking it to the β -barrel. Calculation of the radius of gyration for pOBP over all

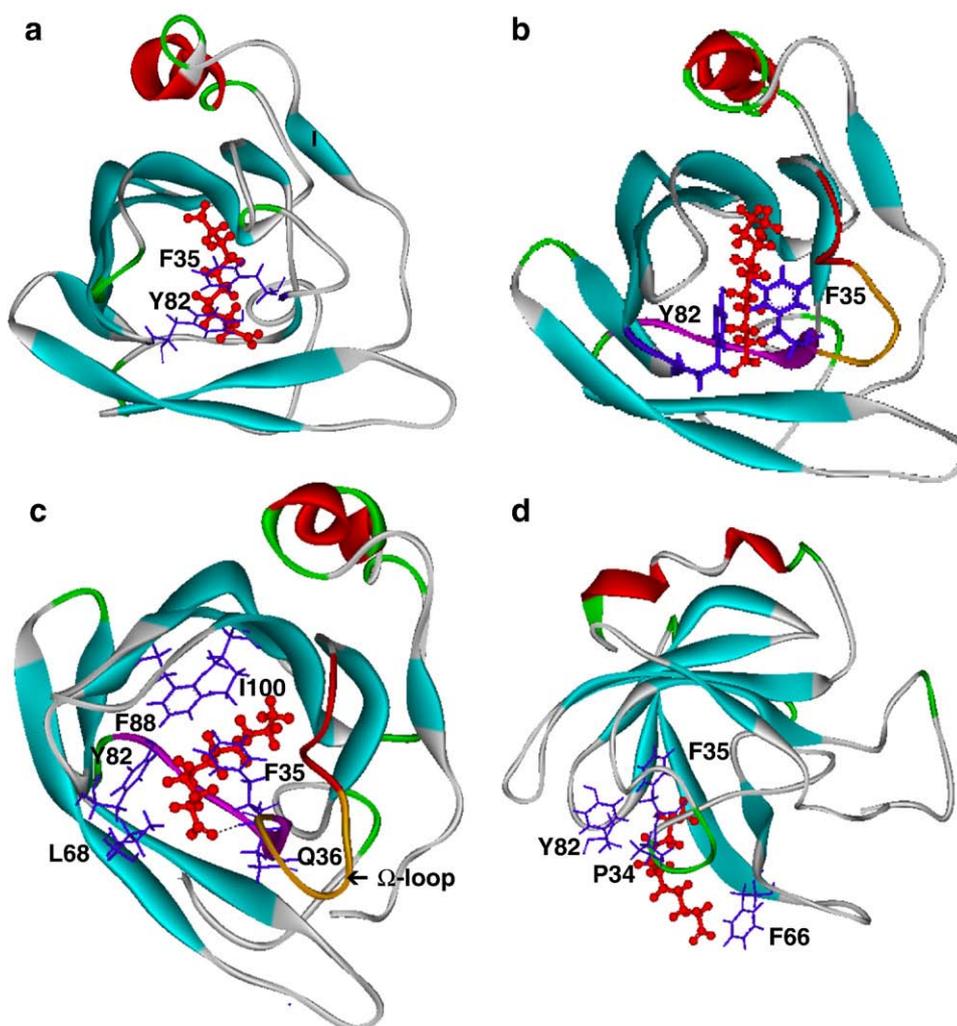


Fig. 1. Unbinding pathway of UND ligand from pOBP. (a) Conformer of pOBP–UND complex obtained after 7.7 ns of a MD run with unrotated side chains of Phe35 and Tyr82 residues. (b) Initial conformer ($t=0$) for the rotated side chains Phe35 and Tyr82 of the pOBP–UND complex. The small helix (residues 25–29) is in red, the Ω -loop (residues 30–36) is in orange, and the preserved part of the B strand is in purple. (c) Fast reorientation (after 60 ps of MD) of the UND ligand via a large bending of its structure to go under the Phe35 residue. (d) Complete unbinding of the ligand starting from manually rotated Phe35 and Tyr82 residues.

conformers recorded over the dynamics revealed a constant value centred about 15 Å. No significant changes in the overall structure (neutral form of pOBP) could also be detected when calculating the inertia moments.

In their dynamical studies on the complex bOBP–dihydromyrcenol (DHM), Mazzini et al. [27] pointed out the importance of the Ω -loop flexibility (residues 30 to 36 for pOBP carrying on the Phe35 key residue), as a potential lid for the ligand. In the present work, we could not observe such a mechanism, as the loop seemed to undergo slight spatial fluctuations along the dynamics. This is in accordance with their calculated changes in the local RMS of the Ω -loop between acidic and neutral forms of pOBP. However, an additive flexibility could be effectively brought to this particular loop by the disappearance of the rigid secondary structure of strand B (residues 37–45) versus time allowing a hypothetical correct side chain reorientation of Phe35 acting on the ligand release. However, it must be kept in mind that the present simulations are force field dependent and MD simulations using the pure CHARMM parameter set in gas phase (not reported here) have also related a geometrical weakness only for this strand that was not observed by the last authors in explicit solvent. All along the dynamical runs, on the opposite side of the exit, a permanent stacking of the two residues Trp16 and Lys120 can be found, in accordance with the predictions of Mazzini et al. [27]. As predicted by these authors, we could also observe the existence of a spatial shift of the terminal helix moiety from its crystal localization.

The amino acid residues having a contact distance <2.4 Å (apart for Tyr82, $d = 2.4$ – 2.9 Å) with any of the ligand atoms are Ala33; Asp110; Glu27; Gln36; Gly109; Ile21, 100; Leu53, 68, 118; Met39, Phe35, 55, 88, 44, 66; Pro34; Thr18 and Tyr82. In particular the aromatic (Phe35, Phe55, Phe88 and Tyr82) and neutral (Met38, Leu53, Val37, Val80) residues exert strong influences of hydrophobic type on the UND carbon chain. These residues have been previously shown by Vincent et al. [16] to be responsible to the dissociation of UND from the truncated pOBP. Some charged residues (Glu27, Lys28, Asp110) also participated to the dissociation via their side chain hydrogen atoms. In particular, interactions between the aldehyde hydrogen and the carboxyl oxygen atoms of Glu27 could be noted along a large part of the MD.

In their dynamical studies on the rat OBP–thymol complex, Hajjar et al. [28] put into evidence the occurrence of some displacements between strands E and D leading to an opening of the structure along the dissociation process. In this work, as the secondary structures of strands A, C-1 and final helix (residues 125–139) remained stable, we calculated the distances versus time between atoms taken in the middle of the strands D, E and F. For that, we chose the C_{α} atoms of the Asp79 (E), Ile69 (D) and Val89 (F) residues. For strands D and E, a mean variation of ± 0.5 Å was calculated around the 8.7 Å mean value (8.7 Å in the crystal state). For strands E and F, a mean distance of 8.4 Å was predicted with fluctuations of ± 0.6 Å. This last value is somewhat lower than the corresponding one found in the crystal state (9.2 Å). Moreover, the distance between the C_{α} atoms of the turn involving residues Asn81 (end of strand B) and Asn85 (start of strand F) increased from the crystal state (4.9 Å) to a mean value of 6.7 Å (MD) without disrupting however the interactions between these two strands. The mean value of 15.3 Å for the distance between the C_{α} carbons of Ile69 (strand D) and Val89 (strand F) as obtained from the dynamics run could be compared with the corresponding crystal data (14.4 Å). In another part, we followed the evolution of the distance between Phe35 and Tyr82 C_{α} carbons (9.3 Å in the crystal state). After a short period following the definitive reorientation of the Phe35 (heating and equilibration), this distance increased gradually from 11 to 13 Å indicating an opening of the binding pocket exit area, constituted by the two loops carrying Phe35 and Tyr82.

Contrary to Hajjar et al. for thymol [28], the hereby artificially accelerated UND dissociation pathway (300–500 ps) takes place along the axis between the D and E strands but not between these two

strands leading to the important participation of the Tyr82, Phe66 and Pro34 residues, the aldehyde hydrogen of the undecanal ligand pointing towards the carbonyl oxygen of Pro34 (Fig. 1) in the half-way of the ligand exclusion out of the binding pocket. As no external solvent was taken into consideration, this last part of the dissociation process could be quite different of the real events. Along this period the mean distance change between the C_{α} carbon atoms of Phe66 and Tyr82 increased by about $\Delta d = 2$ Å and finally decreased to its initial values (12 Å). Similar changes could be noted between the C_{α} atoms of the Pro34–Phe66 and Pro34–Tyr82 pairs and the distance between the alpha carbons of Tyr82 and Phe66 increased from 12.3 to 14.2 Å. Recently, Golebiowski et al. [14,15] performed complete MD studies in explicit solvent on complexes of pOBP with dihydromyrcenol (DHM) and 2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine (IBMP) as ligands and confirmed the exclusion of the ligand between the two strands D and E. The present study is in accordance with the particular roles of Tyr82 and Phe66 residues in the dissociation process. However no direct hydrogen bond between the Pro34 carbonyl oxygen and the hydroxyl hydrogen of tyrosine 82 could be detected here. It is noteworthy that the dissociation process between pOBP and the UND ligand implies in majority the same internal pocket residues than those described by other authors. Our molecular dynamics studies have pointed out the important role of two residues, Phe35 controlling the reorientation of UND towards the exit and Tyr82 acting as a key for a complete release of this ligand, suggesting that the mutation of these two essential residues would have large repercussions on the dissociation and binding abilities of pOBP to the ligand.

3.2. Recombinant proteins characterisation

Porcine OBP and its mutants (pOBP-F35A, pOBP-Y82A and pOBP-F35A/Y82A) were expressed by the yeast *P. pastoris* under control of the methanol-inducible alcohol oxidase promoter and secreted using their natural signal peptide. The production of recombinant pOBP in the yeast *P. pastoris* has already been described [7]. The recombinant proteins were accumulated in the culture medium during three days under methanol induction, without proteolytic degradation. After extensive dialysis, pOBP and its three mutants were purified in a single step by FPLC and each eluted in a single fraction at 0.3, 0.28, 0.26 and 0.265 M NaCl, respectively. The production yield after purification was 19.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pOBP, 31.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pOBP-F35A/Y82A, 19.81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pOBP-F35A and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pOBP-Y82A (corresponding to a three day culture). After dialysis against water, aliquots were dried and checked for integrity and purity of the protein. Fig. 2 shows that recombinant pOBP (wild type and mutants) has the same behaviour and molecular mass than the native protein of respiratory mucosa (RM) extract used as control [7]. The recombinant mutants of pOBP have calculated molecular masses slightly lower than those of recombinant pOBP not visible on the SDS-PAGE (17,935 Da for pOBP, 17,759 Da for pOBP-F35A, 17,743 Da for pOBP-Y82A and 17,667 Da for pOBP-F35A/Y82A). Thus, we did not observe any discrepancy between the calculated and

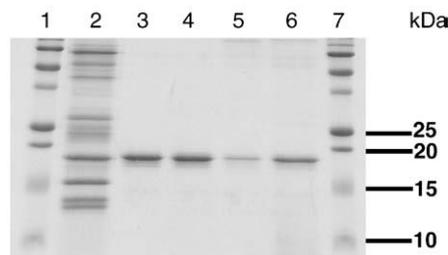


Fig. 2. Biochemical characterisation of native and recombinant pOBP. SDS-PAGE, 1: molecular weight markers (Precision Plus Protein All Blue, BIO-RAD), 2: female respiratory mucosa extract, 3: recombinant wild type pOBP (5 μg), 4: recombinant pOBP-F35A/Y82A (5 μg), 5: recombinant pOBP-F35A (3 μg), 6: recombinant pOBP-Y82A (5 μg), 7: molecular weight markers.

apparent molecular masses, contrary to pOBP expressed in *E. coli* for which authors reported anomalous behaviour in SDS-PAGE, leading to much higher apparent masses [29,30].

A peptide mapping was performed on native pOBP of respiratory mucosa, recombinant wild type pOBP and pOBP-F35A/Y82A, from gels obtained both in native and denaturing conditions. All expected peptides were observed with masses in agreement with the molecular masses calculated from the amino acid sequence (PeptideMass at www.expasy.org, Table 1). As the 50% ACN elution was unsuitable to obtain full peptide maps, we have experimentally determined the best elution percentage of ACN (12.5%) allowing recovery of missing peptides. Using these two ACN elution percentages, the sequence coverage was 79.11% for native and recombinant wild type pOBP and 84.81% for recombinant pOBP-F35A/Y82A. The presence of the C-terminal Lysine ([24], GenBank accession number AF436848) was assessed by the recovery of peptide 153–158 (modified by a carboxyamidomethyl group on Cys155, 705.1766 Da) for native pOBP, peptide 138–158 (2368.1449 Da) for recombinant pOBP, and peptide 138–158 modified by either a carboxyamidomethyl group or a propionide group on Cys155 (2425.3874 Da and 2439.4744 Da) for recombinant pOBP-F35A/Y82A. For the double mutant, the expected masses for peptides 16–40 and 29–40, containing Ala35 instead of Phe35, and 59–87, containing Ala82 instead of Tyr82 confirmed the accurate mutations obtained in the nucleotide sequence by site-directed mutagenesis. The peptides 88–120 for native pOBP and 88–111 for the recombinant wild type protein were missing. This part of the pOBP sequence is extremely difficult to obtain, whatever experimental conditions. These results put together indicate that the yeast machinery properly translated *pOBP* and *pOBP-F35A/Y82A* cDNAs. In addition, the corresponding proteins were secreted by excision of their signal peptide resulting in a pyroglutamic acid in N-terminus (ion 1711.7810 Da; [9]), like their native counterpart. The integrity of single mutants was also checked by peptide mapping (data not shown).

Table 1
Peptide-mass fingerprinting of native, recombinant, and double mutant pOBP.

Modification	Theoretical mass	Peptide	Experimental mass		
			Native pOBP	Recombinant pOBP	Recombinant pOBP-F35A/Y82A
PYRR:1	1711.7810	1–15	1711.8191	1711.8381	1711.9424
	1498.7424	16–28	1498.7301	1498.7608	
	2812.3974	16–40			2812.9112
	1408.7041	29–40	1408.7426	1408.7421	
	1332.6728	29–40			1332.7632
MSO:39	1424.6991	29–40	1424.6841	1424.7299	
	2196.0859	41–58		2196.2343	2196.3162
	1197.5633	41–50	1197.5242	1197.6168	
	1017.5404	51–58	1017.4943	1017.5506	
	1361.7099	48–58		1361.8731	1361.8030
Cys_CAM:63	3264.4749	59–87	3264.4856	3264.3935	
Cys_PAM:63	3186.4644	59–87			3186.9107
	1686.7354	73–87	1686.6635	1686.7462	
MSO:114	3543.8138	88–120			
	2613.2930	88–111			
	2468.2588	112–133			2468.6030
	1537.7380	121–133	1537.6721	1537.7384	
	2022.9978	121–137	2022.8436	2023.0037	2023.1793
	1738.8970	138–152	1738.9223	1738.9059	1738.9686
Cys_CAM:155	705.2872	153–158	705.1766		
	2368.1449	138–158		2367.7375	
Cys_CAM:155	2425.1663	138–158			2425.4251
Cys_PAM:155	2439.1820	138–158			2439.4744
Sequence coverage (%)			79.11	79.11	84.81

PYRR :1 = pyrrolidone carboxylic acid, MSO = methionine sulfoxide, Cys_CAM = carboxyamidomethylated cysteine, Cys_PAM = propionamide cysteine. The peptides specific to the double mutant pOBP-F35A/Y82A are highlighted in grey.

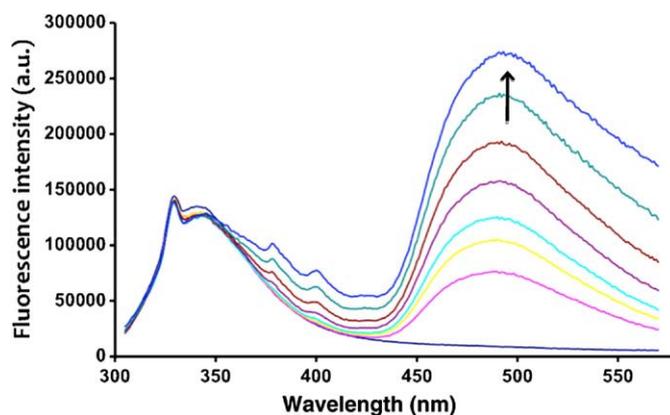


Fig. 3. Titration of a solution of 5 μM recombinant wild type pOBP with increasing concentrations of AMA: 0–0.25–0.5–1–2.5–5–10–15 μM in Tris buffer, pH 7.8 ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm, without polarizer).

3.3. Ligand-binding studies with AMA

Fluorescence spectroscopy has been largely used to study functional properties of pOBP towards ligands, including its stability in denaturing conditions (heat or chemicals). Previous studies were conducted on the native adult form of pOBP, purified from pig nasal tissue [9,29,31,32] or on recombinant wild type or mutant proteins [30,33], both expressed in the bacteria *E. coli*. In this work, the functional properties of the recombinant wild type and mutants pOBP over expressed in *P. pastoris* were monitored and compared by fluorescence spectroscopy with the fluorescent probe 1-aminoanthracene, commonly used for porcine OBP that allows comparisons with previous studies.

The fluorescence emission of AMA is very sensitive to the medium, and notably the presence of alcohol leads to important solvent effects on the fluorescence spectrum [34]. However, the very low amount of ethanol present in the analysed solution did not have any influence on the spectral features obtained. With an excitation wavelength of 256 nm or 375 nm (λ_{max} of the molecule), the fluorescence spectrum of AMA in the buffered water solution exhibited an intense emission band at 566 nm, and another band, characteristic of the anthracene moiety, that presents a vibronic structure relating to the fundamental state of the molecule, with three components located towards 400 nm. In order to simultaneously observe the emission spectra of the protein and fluorescence probe, it seemed judicious to use an excitation at 295 nm.

Fig. 3 illustrates the evolution of the fluorescence emission (recorded without polarizer) of a 5 μM wild type pOBP solution with addition of increasing AMA quantities. The spectral data set is rather complex to analyse, and a spectral decomposition of the whole spectra was carried out to better apprehend the behaviour of the probe. The decomposition of the emission spectrum (in wavenumbers) (Table 2)

Table 2
Wavenumbers and wavelengths of the different bands obtained by spectral decomposition of the fluorescence spectra of pOBP and pOBP + AMA (excitation wavelength: 295 nm; without polarizer).

Band	pOBP		AMA		pOBP + AMA		Assignment
	$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	λ (nm)	$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	λ (nm)	$\bar{\nu}$ (cm^{-1})	λ (nm)	
1	30,429	328	30,429	328	30,429	328	Raman (water)
2	29,327	341			29,327	341	Protein
3	25,401	393			25,401	393	Protein
4			25,734	388	25,734	388	Anthracene moiety
5			17,672	566	17,800	562	Free AMA
6					20,620	484	AMA pocket

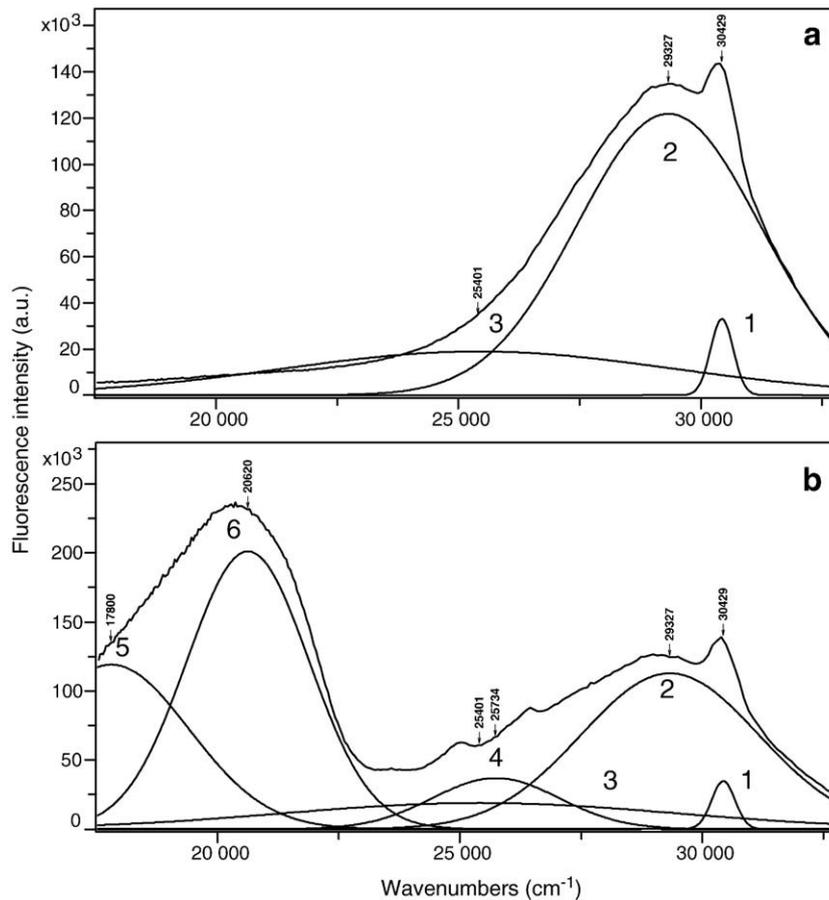


Fig. 4. Spectral decomposition of emission spectrum of recombinant wild type pOBP 5 μM (a), and pOBP 5 μM + AMA 10 μM (b), in Tris buffer. ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, without polarizer). Band 1 is the Raman band of water; 2 and 3 are protein emission bands, 5 and 6 are bands relative to AMA, free and in the binding pocket, respectively.

of pOBP in solution showed the presence of three bands (Fig. 4a). The band at 328 nm (band 1) corresponds to the Raman line of water which was present in all spectra and that allowed normalization of the fluorescence spectra. It was checked that the buffer solution does not present any emission. The band characteristic of the protein involved an intense component at 341 nm and a background emission centred at 393 nm (bands 2 and 3). The single Trp16 residue of pOBP, excited at 295 nm, exhibited an intrinsic fluorescence emission with a maximum at 341 nm; this value is close to those previously observed for native pOBP, purified from nasal mucosa [9] and is typical of a partially buried Trp residue.

The fluorescence spectrum of AMA alone in Tris buffer solution, excited at 295 nm, presents an intense emission at 566 nm (band 5) and a lower band centred at 388 nm relating to the anthracene moieties (band 4) (results not shown). Whatever the AMA concentration, the fluorescence spectrum of the pOBP + AMA system could be fitted with 6 bands (Fig. 4b). Bands numbered from 1 to 4 had identical wavelengths to those met in the protein or pure AMA spectral decomposition. A new band, located at 484 nm (band 6) was characteristic of AMA in interaction with the protein. The evolution analysis of this band with the AMA concentration showed a linear increase in surface or intensity for low AMA concentrations and reached a maximum after $[\text{AMA}] \sim 5 \mu\text{M}$. The horizontal asymptotic behaviour of the band 6 is the result of a saturation phenomenon and let's suppose that this band corresponds to the emission of the probe located inside the binding pocket of pOBP, leading to important changes of the electronic states of AMA. The AMA–pOBP complex formation, using increasing concentration of AMA, could be described by a hyperbolic curve as expected for a one-site binding model (Fig. 5).

Dissociation constant was estimated by non-linear least-squares fit using the equation:

$$y = B_{\text{max}} \cdot [\text{AMA}] / (K_d + [\text{AMA}])$$

where $[\text{AMA}]$ is the concentration of the free probe, y is the specific binding derived by measuring fluorescence intensity and B_{max} is the

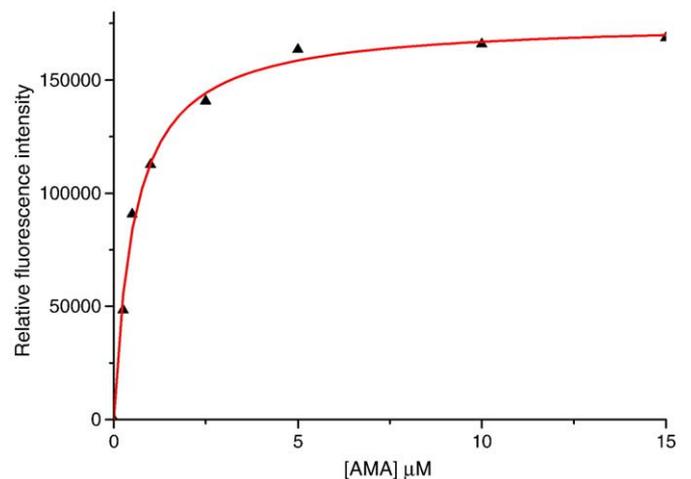


Fig. 5. Binding curve of wild type recombinant pOBP obtained by non-linear least square analysis of the relative fluorescence intensity of AMA band (at 484 nm), as a function of its concentration ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$).

maximum amount of the complex formed at saturation. The K_d value was estimated to $0.55 \pm 0.04 \mu\text{M}$. This value is consistent with other dissociation constant values reported in the literature for AMA–pOBP complexes, but the pOBP expressed in *P. pastoris* in this work seems to have a better affinity for AMA than native pOBP or recombinant pOBP expressed in *E. coli* (1.3 and $1.6 \mu\text{M}$ respectively [9,33]). In the AMA–pOBP system, the emission of free AMA previously observed at 566 nm (band 5) shifted towards 562 nm. This low spectral shift could be assigned to a weak interaction between the probe and the protein surface, like intermolecular hydrogen bond formation, knowing that AMA has properties of both hydrogen-donor and hydrogen-acceptor. The normalized (from the water Raman band) intrinsic fluorescence of Trp16 remained almost unchanged, both in wavelengths and intensity (band 2), which indicated that no conformational modification of the protein occurred with the complex formation, as pOBP denaturation would have caused a red shift of the Trp16 emission maximum as described in [29]. It should be noted, that in the presence of polarizers in both excitation and emission pathways (I_{VV}) with an excitation at 295 nm, only the fluorescence of protein and AMA in the pocket are detected, but the absence of the Raman signal prevents a normalization of the emission intensities. With a polarized excitation at 375 nm, the two different fluorescence bands of AMA can be easily observed (Fig. 6a). For low amount of added probe, only the band relating to the AMA trapped in the pocket (484 nm) clearly appears, then from a concentration of $5 \mu\text{M}$, the emission of the free AMA is detected (562 nm).

The fluorescence spectra of the two single mutants pOBP-F35A and pOBP-Y82A were very similar and presented both an emission maximum at 343 nm (excitation wavelength: 295 nm). With an excitation at 375 nm, the spectral evolutions with successive additions of AMA were identical for the two proteins (Fig. 6b and c) but differed from those of wild type pOBP. In these spectra, only one band was recorded that corresponds to free AMA whereas the fluorescence of the probe in the hydrophobic pocket was not detected. However, a slight red shift was noticed for the free AMA band (574 nm) indicating a weak interaction protein–probe. This interaction is different from that noted for wild type pOBP. These results show that the presence of both Phe35 and Tyr82 aromatic residues is necessary to retain the ligand in the binding pocket of pOBP. This fact was confirmed by the analysis of the double mutant. The titration of a $5 \mu\text{M}$ pOBP-F35A/Y82A in Tris buffer solution by AMA, monitored by fluorescence spectroscopy gave the same results than those obtained for pOBP-F35A or pOBP-Y82A. The emission maximum of pOBP-F35A/Y82A was located at 343 nm, and did not shift upon AMA addition. The analysis of the spectral features obtained with the pOBP-F35A/Y82A + AMA system showed the absence of a fluorescence contribution of the probe trapped in the pocket of the double mutant protein (Fig. 6d).

These experimental data confirmed the involvement of Phe35 and Tyr82 in the uptake of ligand by pOBP. Displacement experiments were impossible to perform, due to the fact that AMA did not enter the binding pocket of recombinant mutants, so we can just hypothesize that these two residues are also involved in the dissociation process, as indicated by molecular dynamics studies.

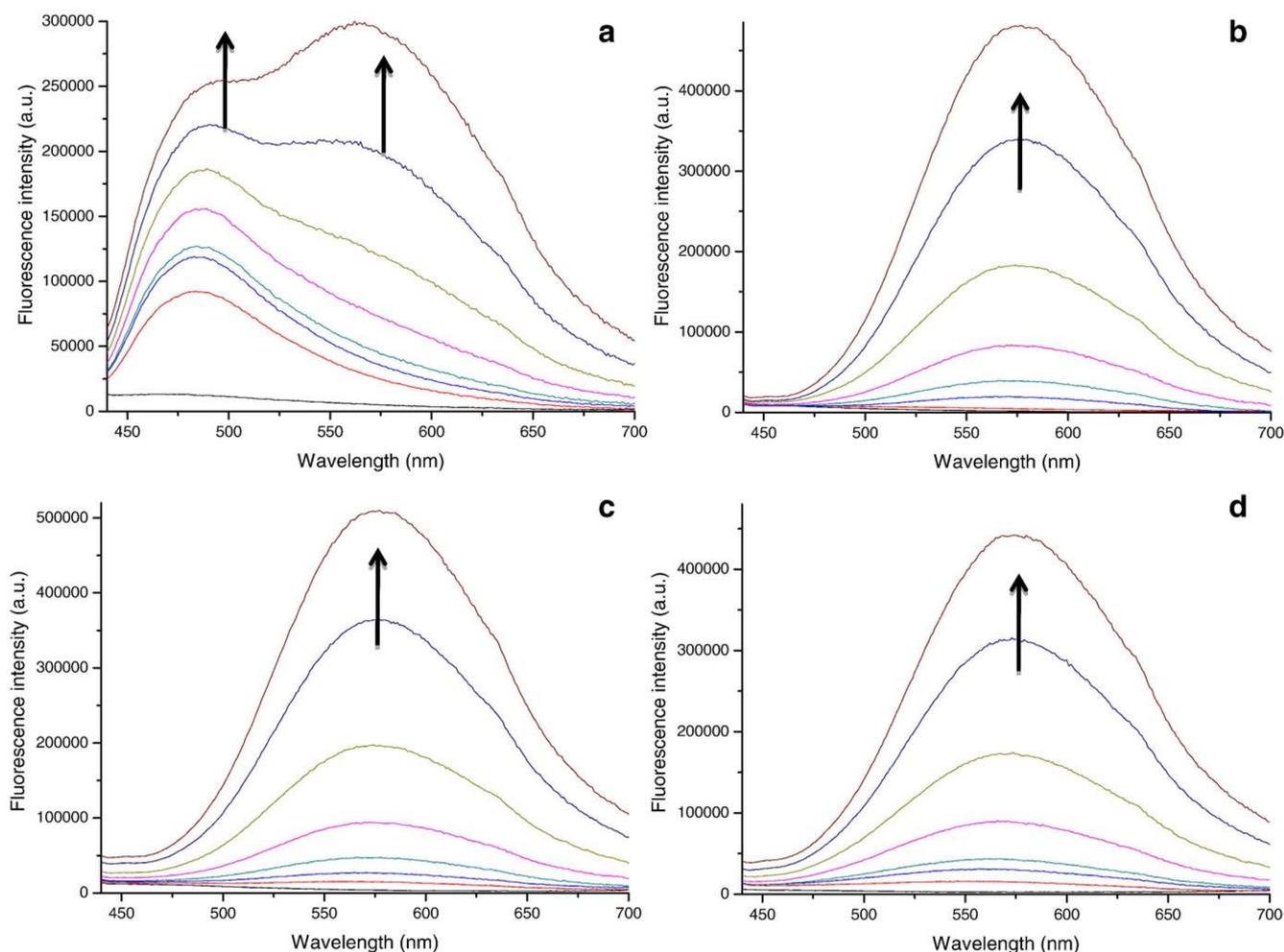


Fig. 6. Titration of a solution of $5 \mu\text{M}$ pOBP (a) pOBP-F35A (b), pOBP-Y82A (c) and pOBP-F35A/Y82A (d) with increasing concentrations of AMA: 0–0.25–0.5–1–2.5–5–10–15 μM in Tris buffer, pH 7.8 ($\lambda_{\text{ex}} = 375$, with polarizers in both excitation and emission beams).

Acknowledgements

The authors thank the Centre de Ressources Informatiques de Haute-Normandie (CRIHAN) located at Saint-Etienne du Rouvray (France) for their support with the IBMp575 cluster through the contract "CPER 2000–2006". The authors are grateful to Anthony Billot for his technical assistance in fluorescence spectroscopy experiments. We thank two anonymous reviewers for their stimulating and interesting comments that helped us to greatly improve the manuscript.

References

- [1] M. Tegoni, P. Pelosi, F. Vincent, S. Spinelli, V. Campanacci, S. Grolli, R. Ramoni, C. Cambillau, Mammalian odorant binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta* 1482 (2000) 229–240.
- [2] P. Pelosi, Odorant binding proteins, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29 (1994) 199–228.
- [3] P. Pelosi, Perireceptor events in olfaction, *J. Neurobiol.* 30 (1996) 3–19.
- [4] J. Pevsner, S.H. Snyder, Odorant-binding protein: odorant transport function in vertebrate nasal epithelium, *Chem. Senses* 15 (1990) 217–222.
- [5] M. Tegoni, V. Campanacci, C. Cambillau, Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects, *Trends Biochem. Sci.* 29 (2004) 257–264.
- [6] V. Matarazzo, N. Zsürger, J.C. Guillemot, O. Clot-Faybesse, J.M. Botto, C. Dal Farra, M. Crowe, J. Demaille, J.P. Vincent, J. Mazella, C. Ronin, Porcine odorant-binding protein selectively binds to a human olfactory receptor, *Chem. Senses* 27 (2002) 691–701.
- [7] G. Guiraudie-Capraz, O. Clot-Faybesse, P. Pageat, C. Malosse, A.H. Cain, C. Ronin, P. Nagnan-Le Meillour, Heterologous expression of piglet odorant-binding protein in *Pichia pastoris*: a comparative structural and functional characterization with native forms, *J. Biotechnol.* 117 (2005) 11–19.
- [8] M. Dal Monte, I. Andreini, R. Revoltella, P. Pelosi, Purification and characterization of two odorant-binding proteins from nasal tissue of rabbit and pig, *Comp. Biochem. Physiol.* 99B (1991) 445–451.
- [9] S. Paolini, F. Tanfani, C. Fini, E. Bertoli, P. Pelosi, Porcine odorant-binding protein: structural stability and ligand affinities measured by Fourier-transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1431 (1999) 179–188.
- [10] T.V. Burova, Y. Choiset, C.K. Jankowski, T. Haertlé, Conformational stability and binding properties of porcine odorant binding protein, *Biochemistry* 38 (1999) 15043–15051.
- [11] L. Briand, J.C. Huet, V. Perez, G. Lenoir, C. Nespoulous, Y. Boucher, D. Trotier, J.C. Pernollet, Odorant and pheromone binding by aphrodisin, a hamster aphrodisiac protein, *FEBS Lett.* 476 (2000) 179–185.
- [12] S. Spinelli, R. Ramoni, S. Grolli, J. Bonicel, C. Cambillau, M. Tegoni, The structure of the monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism, *Biochemistry* 37 (1998) 7913–7918.
- [13] R. Ramoni, F. Vincent, S. Grolli, V. Conti, C. Malosse, F.D. Boyer, P. Nagnan-Le Meillour, S. Spinelli, C. Cambillau, M. Tegoni, The insect attractant 1-octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant-binding protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 7150–7155.
- [14] J. Golebiowski, S. Antonczak, D. Cabrol-Bass, Molecular dynamics studies of odorant binding protein free of ligand and complexed to pyrazine and octenol, *J. Mol. Struct. (Theochem)* 763 (2006) 165–174.
- [15] J. Golebiowski, S. Antonczak, S. Fiorucci, D. Cabrol-Bass, Mechanistic events underlying odorant binding chemoreception, *Proteins* 67 (2007) 448–458.
- [16] F. Vincent, S. Spinelli, R. Ramoni, S. Grolli, P. Pelosi, C. Cambillau, M. Tegoni, Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 127–139.
- [17] A.D. MacKerell Jr., D. Bashford, R.L. Bellott, R.L. Dunbrack Jr., J.D. Evanseck, M.J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F.T.K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D.T. Nguyen, B. Prodhom, W.E. Reiher III, B. Roux, M. Schlenkrich, J.C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorkiewicz-Kuczera, D. Yin, M. Karplus, All-atom empirical potential for molecular modelling and dynamics studies of proteins, *J. Phys. Chem. B.* 102 (1998) 3586.
- [18] B.R. Brooks, R.E. Bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, CHARMM – a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations, *J. Comp. Chem.* 93 (1983) 187–217.
- [19] P. Derreumaux, G. Vergoten, A new spectroscopic molecular mechanics force field. Parameters for proteins, *J. Chem. Phys.* 102 (1995) 8586.
- [20] P. Lagant, D. Nolde, R. Stote, G. Vergoten, M. Karplus, Increasing normal modes analysis accuracy: the SPASIBA spectroscopic force field introduced into the CHARMM program, *J. Phys. Chem. A* 108 (2004) 4019–4029.
- [21] G. Vergoten, I. Mazur, P. Lagant, J.C. Michalski, J.P. Zanetta, The SPASIBA force field as an essential tool for studying the structure and dynamics of saccharides, *Biochimie* 85 (2003) 65–73.
- [22] P. Derreumaux, M. Dauchez, G. Vergoten, The structure and vibrational frequencies of a series of alkanes using the SPASIBA force field, *J. Mol. Struct.* 295 (1993) 203–221.
- [23] A. Zanoun, V. Durier, A. Belaidi, G. Vergoten, The SPASIBA force field of aldehydes. Part I: structure and vibrational wavenumbers of methanal, ethanal and propanal, *J. Mol. Struct.* 476 (1999) 261–270.
- [24] G. Guiraudie, P. Pageat, A.H. Cain, I. Madec, P. Nagnan-Le Meillour, Functional characterization of olfactory binding proteins for appeasing compounds and molecular cloning in the vomeronasal organ of pre-pubertal pigs, *Chem. Senses* 28 (2003) 609–619.
- [25] G. Guiraudie-Capraz, M.C. Slomianny, P. Pageat, C. Malosse, A.-H. Cain, P. Orgeur, P. Nagnan-Le Meillour, Biochemical and chemical supports for a transnatal olfactory continuity through sow maternal fluids, *Chem. Senses* 30 (2005) 241–251.
- [26] J.R. Lakowitz, Principles of Fluorescence Spectroscopy 2nd ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
- [27] A. Mazzini, E. Polverini, M. Parisi, R.T. Sorbi, R. Favilla, Dissociation and unfolding of bovine odorant binding protein at acidic pH, *J. Struct. Biol.* 159 (2007) 82–91.
- [28] E. Hajjar, D. Perahia, H. Débat, C. Nespoulos, C.H. Robert, Odorant binding and conformational dynamics in the odorant binding protein, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 29929–29937.
- [29] M. Parisi, A. Mazzini, R. Sorbi, R. Ramoni, S. Grolli, R. Favilla, Unfolding and refolding of porcine odorant binding protein in guanidinium hydrochloride: equilibrium studies at neutral pH, *Biochim. Biophys. Acta* 1652 (2003) 115–125.
- [30] M. Parisi, A. Mazzini, R. Tibor Sorbi, R. Ramoni, S. Grolli, R. Favilla, Role of the disulfide bridge in folding, stability and function of porcine odorant binding protein: spectroscopic equilibrium studies on G63A/C155A double mutant, *Biochim. Biophys. Acta* 1750 (2005) 30–39.
- [31] O.V. Stepanenko, A. Marabotti, M.M. Kuznetsova, K.K. Turoverov, C. Fini, A. Varriale, M. Staiano, M. Rossi, S. D'Auria, Hydrophobic interactions and ionic networks play an important role in thermal stability and denaturation mechanism of the porcine odorant-binding protein, *Proteins* 71 (2008) 35–44.
- [32] M. Staiano, M. Saviano, P. Herman, Z. Gryczynski, C. Fini, A. Varriale, A. Parracino, A. Bisgaard Kold, M. Rossi, S. D'Auria, Time-resolved fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulations point out the effects of pressure on the stability and dynamics of the porcine odorant-binding protein, *Biopolymers* 89 (2007) 284–291.
- [33] Y. Wei, A. Brandazza, P. Pelosi, Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutants of odorant-binding protein: a first step towards biosensors for environmental monitoring, *Biochim. Biophys. Acta* 1784 (2008) 666–671.
- [34] S. Watanabe, K. Kumagai, M. Hasegawa, M. Kobayashi, J. Okubo, T. Yoshinaga, H. Hiratsuka, T. Hoshi, Hydrogen bond formations of 1-aminoanthracene in the ground and excited electronic states with protic solvent molecules, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 73 (2000) 1783–1789.

Natural Ligands of Porcine Olfactory Binding Proteins

Chrystelle Le Danvic · Gaelle Guiraudie-Capraz ·
Djamel Abderrahmani · Jean-Pierre Zanetta ·
Patricia Nagnan-Le Meillour

Received: 20 February 2009 / Revised: 8 May 2009 / Accepted: 15 May 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Abstract Knowledge of endogenous ligands of olfactory binding proteins is a prerequisite for studying their role in odor and pheromone transduction. Here, we report the extraction, derivatization, and characterization by gas chromatography-mass spectrometry of the natural ligands of pig, *Sus scrofa* (L.), Von Ebner's Gland protein (VEG) and odorant binding protein (OBP). We identified two isoforms (VEG1 and VEG2), which differed only by the linkage of an *O*-N-acetylglucosamine (*O*-GlcNac) group on VEG1. The natural ligands of VEG1 were characterized as two isomers of testosterone, whereas ligands of VEG2 and OBP were fatty acids or their derivatives. Our findings suggest that the binding specificity of VEG1 for steroids is governed by the presence of an *O*-GlcNac moiety on the protein. This specificity was confirmed by the binding of radiolabeled testosterone only by VEG1 in an in-gel binding assay. This is the first evidence for a post-translational modification in the process of odorant discrimination by olfactory binding proteins.

Keywords Endogenous ligand · Fatty acid · MALDI-TOF mass spectrometry · Odorant binding protein · Olfaction · *O*-N-acetylglucosamine · *Sus scrofa* · Testosterone · Tryptic digestion · Von Ebner's Gland protein

Introduction

Olfactory binding proteins are small soluble proteins secreted in a variety of tissues and organs related to chemical communication (Tegoni et al. 2000). They are probably an adaptation to terrestrial life, as members of this protein group seem to be absent in fish, but widespread in insects, mammals, and reptiles. Their physiological role depends on their localization: 1) binding and transport of odors and pheromones in most tissues and fluids, as odorant binding proteins (OBP) of saliva (Marchese et al. 1998) and amniotic fluid (Guiraudie-Capraz et al. 2005), hamster aphrodisin (Singer et al. 1986), or tear lipocalin in mammals (Garibotti et al. 1995; Redl 2000), and 2) odor and pheromone transduction in olfactory organs, as pheromone-binding proteins (PBP) in insects (Xu et al. 2005). This latter physiological role is better understood in insects than in mammals, where the involvement of olfactory binding proteins in odor discrimination remains to be elucidated. Binding to specific ligands has only been demonstrated for the sub-class of pheromone-binding proteins such as Major Urinary Proteins (MUP) of rodents (Robertson et al. 1993), salivary lipocalin (SAL) in the pig, *Sus scrofa* (L.) (Marchese et al. 1998; Scaloni et al. 2001) and aphrodisin in hamsters (Briand et al. 2004). In these species, the identification of the natural endogenous ligands of these proteins was a prerequisite for studying their binding properties and understanding their physiological role.

C. Le Danvic · D. Abderrahmani · P. Nagnan-Le Meillour (✉)
INRA, UMR 8576 CNRS/Université Lille1,
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle,
59655 Villeneuve d'Ascq CEDEX, France
e-mail: patricia.le-meillour@univ-lille1.fr

G. Guiraudie-Capraz
Université de Provence, UMR 6149 CNRS/Université de Provence,
Laboratoire de Neurobiologie Intégrative et Adaptative,
3 place Victor Hugo,
13331 Marseille CEDEX 03, France

J.-P. Zanetta
CNRS, UMR 8576 CNRS/Université Lille1,
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle,
59655 Villeneuve d'Ascq CEDEX, France

Porcine olfactory binding proteins have been studied extensively because one of the first mammalian OBP was identified in this species (Dal Monte et al. 1991; Paolini et al. 1998). Besides porcine OBP (pOBP), two other proteins [SAL and Von Ebner's Gland protein (VEG)] were identified and characterized from nasal tissue (Scaloni et al. 2001) and the vomeronasal organ (VNO) (Guiraudie et al. 2003). The natural ligands of SAL were identified as androstenol and androstenone, the two components of the boar sex pheromone (Marchese et al. 1998; Loebel et al. 2000). pOBP extracted from nasal tissue does not bear a ligand (Paolini et al. 1998), contrary to the bovine OBP, which contains 1-octen-3-ol as its natural ligand (Ramoni et al. 2001). Finally, attempts to identify the natural ligand of porcine VEG were unsuccessful (Garibotti et al. 1995; Burova et al. 2000; Scaloni et al. 2001). The human counterpart of porcine VEG, the tear lipocalin, was found to contain fatty acids, cholesterol, triacylglycerol, and fatty alcohols (Glasgow et al. 1995), which were not bound or were only weakly bound by porcine VEG in binding assays (Scaloni et al. 2001).

In a previous study, we used an in-gel binding assay to examine the partitioning of several ligands (fatty acids and steroids) among olfactory binding proteins (OBP, SAL, and VEG) of the respiratory mucosa and the VNO of the pig (Guiraudie et al. 2003). In both tissues, two isoforms of VEG displayed different affinities for the ligands: the slower migrating form (VEG1) bound the steroid progesterone but not fatty acids, whereas the faster migrating form (VEG2) only bound fatty acids. We hypothesized that the natural VEG1 ligand could be a steroid. Here, we report the extraction, derivatization, and characterization by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) of the natural ligands of porcine VEG1, VEG2, and OBP.

Methods and Materials

Protein Extraction from Biological Samples Animals (Large White pre-pubertal male pigs) were slaughtered in agreement with UE directives about animal welfare. VNO were dissected immediately after death and stored at -80°C (Guiraudie et al. 2003). Native proteins were extracted from 10 mg of VNO by adding 800 μl of a 2:1 solution of chloroform/methanol (v:v) to the tissue in Eppendorf tubes on ice. After a brief vortex homogenization, samples were centrifuged at $13,000\times g$ for 10 min at 4°C , to separate the different phases. As the tissues contained water, three phases were obtained: the upper chloroform phase (containing lipids), the water interface containing the tissue, and the methanol phase containing proteins. The methanol phase was dried under vacuum (Speed-Vac, Eppendorf, Le Pecq, France) and stored at -20°C until use.

Binding Assay with Radiolabeled Analogs of Steroids The principle of the in-gel binding assay and its protocol have been fully described (Guiraudie et al. 2003). Tritiated testosterone ($17\text{-}\beta\text{-hydroxy-4-androsten-3-one}$, ($1,2,6,7\text{-}^3\text{H}[\text{N}]$)) and progesterone ($4\text{-pregen-3,20-dione}$; ($1,2,6,7\text{-}^3\text{H}[\text{N}]$)) were from Sigma-Aldrich (La Verpillière, France) and had a specific activity of 3.7 TBq/mmol and 3.4 TBq/mmol, respectively. An aliquot of VNO extract in sample buffer (identical to Fig. 1) was incubated for 30 min on ice with an ethanolic solution of either tritiated testosterone or tritiated progesterone ($5\mu\text{l}$, $3\times 10^7\text{Bq}$), before analysis by electrophoresis, blotting, and fluorography (Guiraudie et al. 2003).

Identification of the Binding Proteins by In-Gel Digest, Peptide Extraction, and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis An aliquot of each biological sample used for ligand extraction was loaded onto a 0.75 mm thick gel, and electrophoresis was run in non-denaturing conditions to check the identity of proteins by peptide mapping (Nagnan-Le Meillour et al. 2009). Peptides resulting from the trypsin digestion were extracted by adding 30 μl of a 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) solution in 50% acetonitrile. A solution of $\alpha\text{-cyano-4-hydroxycinnamic acid}$ (Sigma-Aldrich) at a concentration of 10 mg/ml in 0.1% 2:1 acetonitrile/TFA (v:v) was used as matrix. The peptides were analyzed on a Voyager DE Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France), in positive linear mode. An external calibration of peptides covering the 1,000–4,000 mass range was performed for each measurement. Protein identification was achieved by comparison of measured peptide masses with the theoretical OBP (GenBank accession number NP_998961) and VEG (S77587) peptide maps (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>). The SAL was

Fig. 1 Separation of pig, *Sus scrofa*, VNO proteins by native-PAGE. Position of bands 1, 2, and 3 used for both peptide mapping and ligand extraction are indicated



Table 1 MALDI-TOF MS analysis of peptides obtained after trypsin digestion of reduced and carboxymethylated bands 1 and 2 from extracts of pig, *Sus scrofa*, vomeronasal organ (VNO) tissue

Modifications	Theoretical mass	Peptide	Measured mass	
			VNO band 1	VNO band 2
PYRR ^a :1	1750.8922	1–16	1750.7416	1750.9074
MSO ^b :22	1751.8672	17–31	1751.7394	1751.9078
	1224.7562	32–42	1224.5975	
	1617.7907	70–83		1617.7398
	1773.8918	70–84	1773.7189	1773.8719
	1489.6958	71–83		1489.6173
	1645.7669	71–84	1645.6264	1645.7855
	918.5658	85–92	918.3688	918.4803
Cys_CAM ^c :101	2323.1023	93–111	2322.8579	2323.1255
	1956.9661	115–131	1956.7757	1956.9635
	2412.2153	115–135		2412.1810
	1986.9403	119–135	1986.7655	1986.9447
Cys_CAM ^c :152	2140.0087	138–157		2140.0189
Sequence coverage (%)			68.15	82.16

^a PYRR: pyrrolidone carboxylic acid.

^b MSO: methionine sulfoxide.

^c Cys_CAM: carbamidomethyl-cysteine.

not included in this study as its endogenous ligands are known.

Extraction of Endogenous Ligands and Derivatization Protein extracts were submitted to electrophoresis in non-denaturing conditions as previously described (Guiraudie et al. 2003). Gels (1.5 mm thickness) were stained with colloidal Coomassie blue (Guiraudie et al. 2003) until the bands just appeared. Placing the gels in water stopped staining, and the band slices were cut immediately with a razor blade and put into an Eppendorf tube. As a control, portions of the gel corresponding to the sample buffer without proteins also were dissected. Band slices were loaded with 500 μ l of 2:1 chloroform/methanol (v:v) and ground by using a conical pestle at room temperature. After a brief centrifugation (13,000 \times g for 5 min at room tempera-

ture), the supernatant was recovered and dried at room temperature in a rotary evaporator. At room temperature and under harsh extraction, the proteins were denatured, and they liberated their ligands. The remaining water was eliminated in the same conditions as an acetonitrile/water azeotrope obtained after addition of 500 μ l acetonitrile dried previously on calcinated calcium chloride (Zanetta et al. 1999).

The dry residue was taken up in 200 μ l of dried acetonitrile, and 50 μ l of heptafluorobutyric anhydride (HFBA) (Fluka, Sigma-Aldrich) were added. The samples were submitted to a flash acetylation for 1 min in a sand bath at 150 $^{\circ}$ C. Before GC/MS analyses, individual samples were dried under a stream of nitrogen and supplemented with 100 μ l of dried acetonitrile. In order to verify the nature of the fatty ligands, after GC-MS analyses, the samples were evaporated under a stream of nitrogen, then

Fig. 2 Monoisotopic mass spectrum of the MALDI-TOF MS analysis of reduced and carboxymethylated band 1 of the pig VNO extract after trypsin digestion. Insert: magnification of the 1,700–2,400 m/z zone

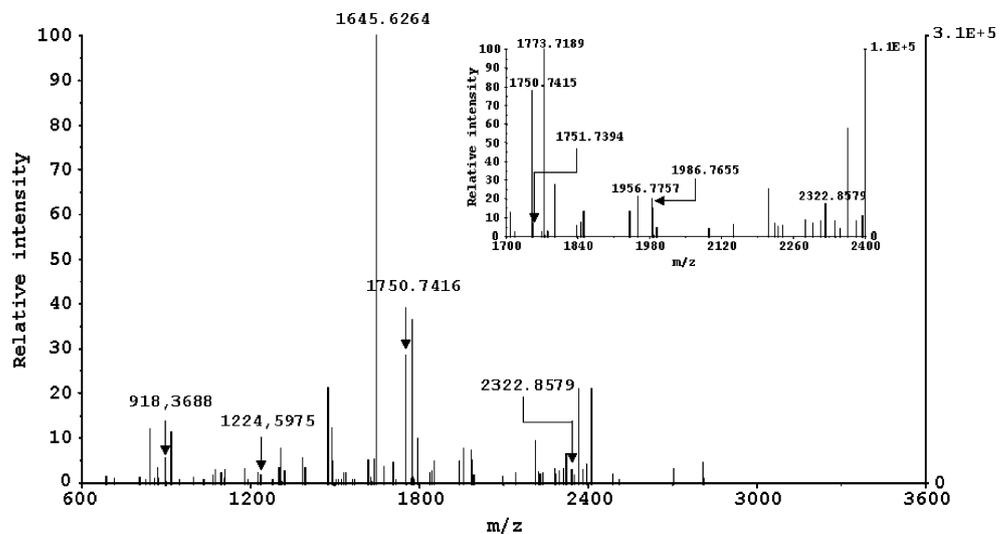


Fig. 3 Monoisotopic mass spectrum of the MALDI-TOF MS analysis of reduced and carboxymethylated band 2 of the pig VNO extract after trypsin digestion. Insert: magnification of the 1,700–2,400 m/z zone

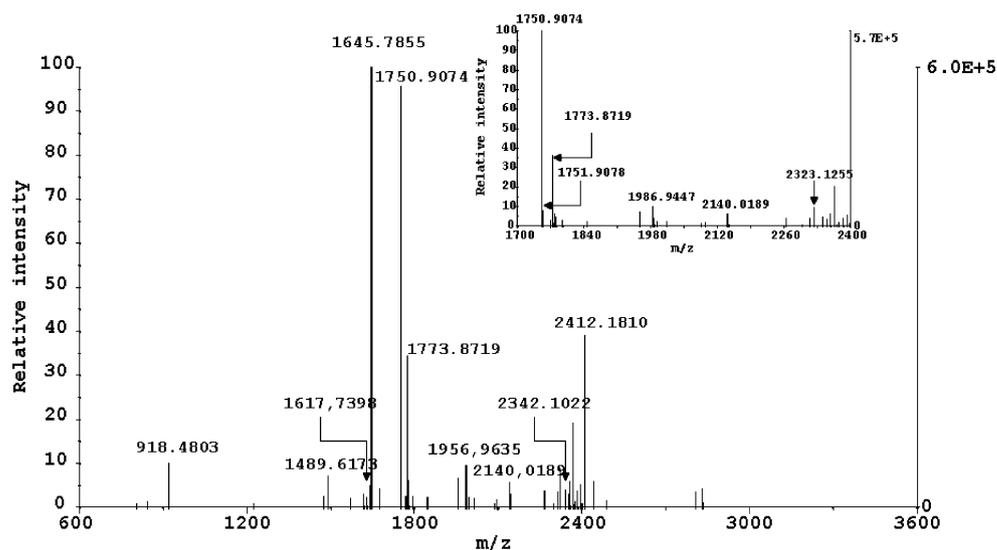


Fig. 4 Characterization of the *O*-GlcNac moiety in pig VEG1. **A)** Fragmentation scheme of peracetylated *O*-GlcNac. **B)** Selected monitoring of ions (m/z 84, 102, 318) typical of peracetylated *O*-GlcNac. **C)** Mass spectrum of the peak with $R_t = 31.58$ min

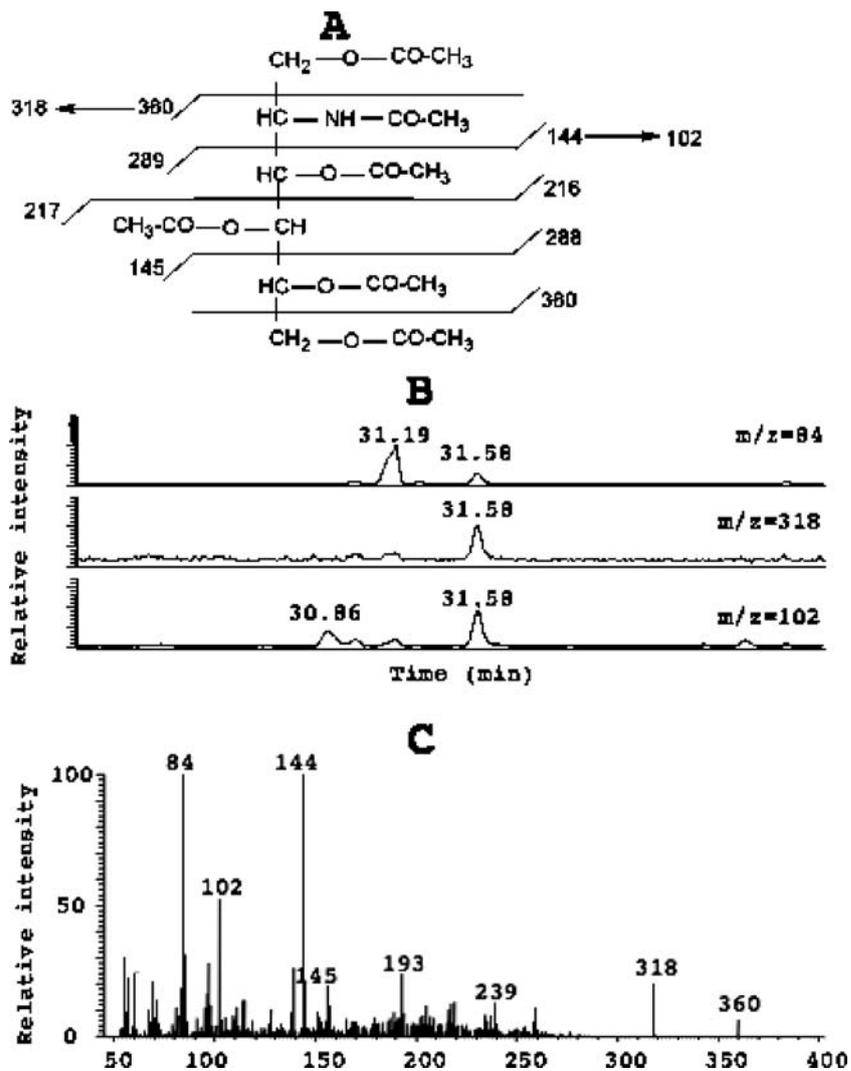
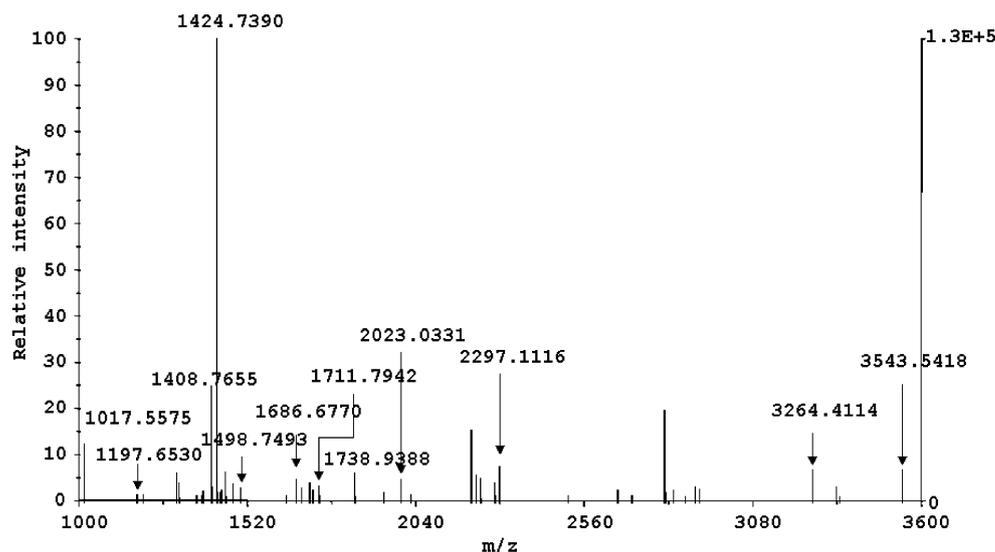


Fig. 5 Monoisotopic mass spectrum of the MALDI-TOF MS analysis of reduced and carboxymethylated band 3 of the pig VNO extract after trypsin digestion



supplemented with 200 μ l anhydrous methanol and 200 μ l of a diazomethane solution in diethyl ether. The samples were left for 1 h at room temperature, dried under a stream of nitrogen, taken up in dried acetonitrile, and analyzed by GC-MS under the same conditions.

Identification of the Ligands by Gas chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) Ligands were separated by using a Carlo Erba GC 8000 gas chromatograph equipped with a 25 m \times 0.32 mm CP-Sil5 CB Low bleed/MS capillary column, 0.25 μ m film phase (Chrompack, Les Ulis, France). The temperature of the Ross injector was 260 $^{\circ}$ C, and the samples were analyzed with the following temperature program: 90 $^{\circ}$ C for 3 min, then 5 $^{\circ}$ C/min until 260 $^{\circ}$ C, followed by 20 min at 260 $^{\circ}$ C. The column was coupled to a Finnigan Automass II mass spectrometer (mass detection limit 1000). Analyses were performed routinely in the electron impact (EI) mode (ionization energy 70 eV; source temperature 150 $^{\circ}$ C). In order to preserve the filament of the ionization source, GC/MS

records were performed 5 min after the injection of the sample. The EI mode of MS analysis was chosen because it provided fundamental information on the structure of the compound(s) and allowed a general representative total ion current (TIC) response for the different kinds of compounds. Data were recovered between 45 and 1000 *amu*. Integrations of the peaks were performed on the TIC chromatogram with Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France). The standard compounds (testosterone, fatty acids) were from Sigma-Aldrich.

Characterization of the O-N-acetylglucosamine Moiety The YinOYang server at www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/ (via www.expasy.org) was used to predict potential sites of O-N-acetylglucosamine (O-GlcNac) modification. The presence of O-GlcNac was investigated experimentally by using beta-elimination. This reaction occurs when O-GlcNac beta-linked serine and threonine residues of proteins are exposed to strongly alkaline conditions (Oda et al. 2001). For beta-

Table 2 MALDI-TOF MS analysis of peptides obtained after trypsin digestion of reduced and carboxymethylated band 3 from extracts of pig, *Sus scrofa*, vomeronasal organ (VNO) tissue

Modifications	Theoretical mass	Peptide	Measured massVNO band 3
PYRR ^a :1	1711.7810	1–15	1711.7942
	1498.7424	16–28	1498.7493
	1408.7041	29–40	1408.7655
MSO ^b :39	1424.6991	29–40	1424.7390
	1197.5633	41–50	1197.6530
	1017.5404	51–58	1017.5575
Cys_CAM ^c :63	3264.4749	59–87	3264.4114
	1686.7354	73–87	1686.6770
MSO ^b :114	3543.8138	88–120	3543.5418
	2022.9978	121–137	2023.0331
	1738.8970	138–152	1738.9388
	2297.0714	138–157	2297.1116
Sequence coverage (%)			100

^a PYRR: pyrrolidone carboxylic acid.

^b MSO: methionine sulfoxide.

^c Cys_CAM: carbamidomethyl-cysteine.

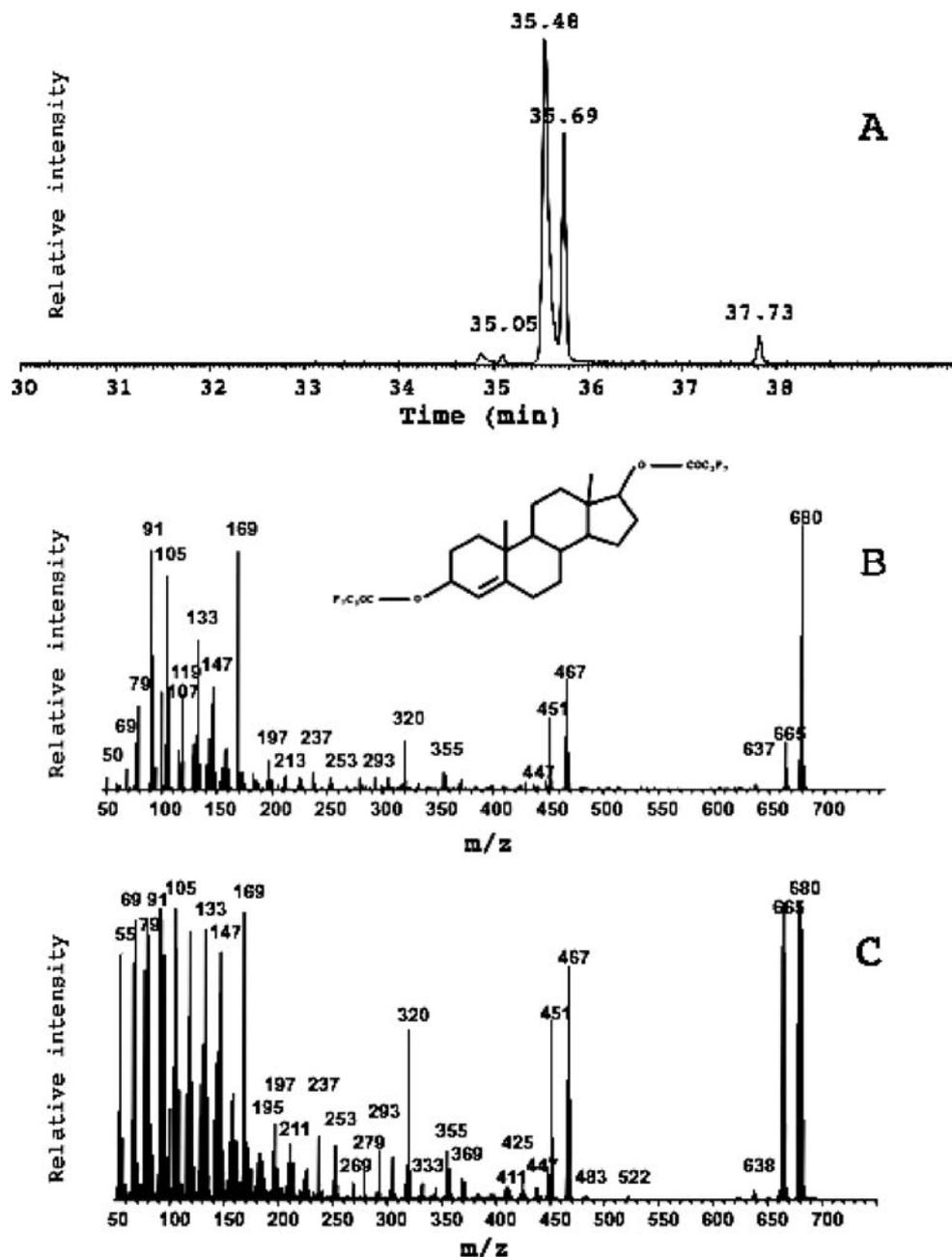
elimination, proteins were separated by native-PAGE as described above, then electroblotted onto PVDF membrane (Immobilon P, Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) as described in Guiraudie et al. (2003). The two bands containing the VEG isoforms were cut with a razor blade and placed immediately (to avoid drying) in a solution of 0.5 M NaBH₄, 0.1 M NaOH for 18 h at 45°C. The reaction was stopped by the dropwise addition of acetic acid on ice. After evaporation under nitrogen, methanol was added, then evaporated again to eliminate the methylborates (repeated x 3). The dry sample was resuspended in 1 ml acetic anhydride for 4 h at 100°C to peracetylate the alditols that resulted from the beta-elimination. The peracetylated

alditols were extracted with chloroform and analyzed by GC-MS by using a BPX70 capillary column (30 m×0.32 mm) coupled to a Finnigan Automass II mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). The temperature program was from 150°C to 230°C at 3°C/min, then 230°C to 250°C at 5°C/min.

Results

Characterization of Binding Proteins An aliquot of each of the VNO extracts used for ligand identification was loaded onto a 0.75 mm-thick gel in parallel for peptide mapping to

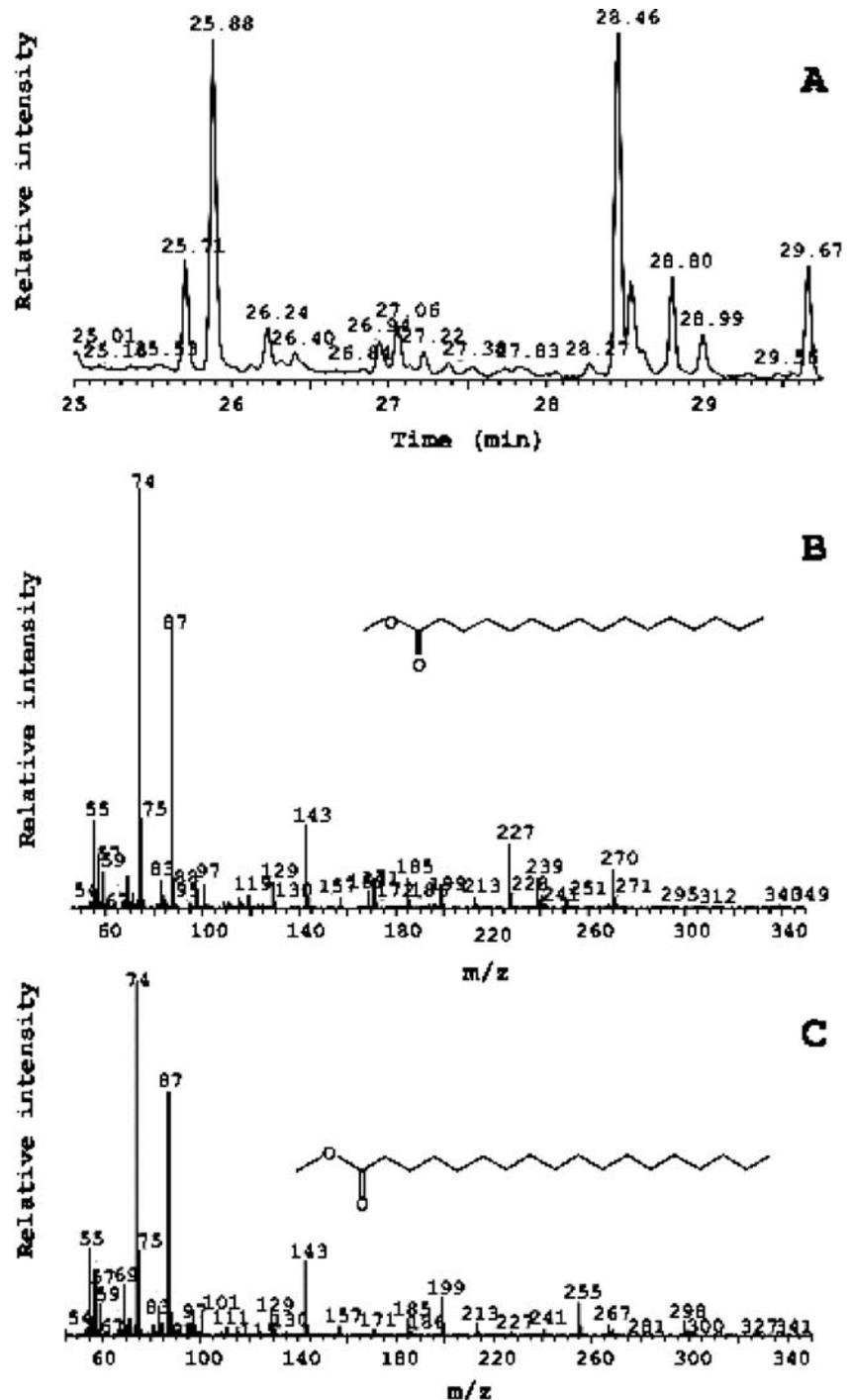
Fig. 6 Characterization of VEG1 ligands. **A)** Total ion chromatogram of ligand extraction from pig VEG1. **B)** Mass spectrum of the peak with $R_t = 35.69$ min. **C)** Mass spectrum of derivatized standard testosterone (Sigma-Aldrich)



confirm the identity of the proteins used for ligand extraction (Fig. 1). Bands 1 to 3 were analyzed to check the presence of VEG and OBP (Guiraudie et al. 2003). MALDI-TOF MS analysis confirmed the presence of VEG1 in band 1, VEG2 in band 2, and OBP in band 3. A comparison of the peptides from the tryptic digestion of bands 1 and 2 from the VNO to the theoretical peptides from VEG digestion by the same enzyme revealed that the

VEG sequence was covered at 68.15% in band 1 and 82.16% in band 2 (Table 1). The difference between the two VEGs is the absence in VEG1 of the peptide 138–157 (m/z : 2,140.0087, Figs. 2 and 3) typical of the C-terminus of the protein (Guiraudie et al. 2003). Because the presence of extra-groups linked to peculiar amino acids may explain the absence of peptides (e.g., SAL bears N-glycosylations branched on Asn53, Scaloni et al. 2001), we searched for

Fig. 7 Characterization of pig VEG2 ligands. **A)** Total ion chromatogram of ligand extraction from VEG2. **B)** Mass spectrum of peak with $R_t = 25.71$ identified as hexadecanoic acid methyl ester. **C)** Mass spectrum of peak with $R_t = 29.67$, identified as octadecenoic acid methyl ester. Peaks of $R_t = 25.88$ and $R_t = 28.80$ were identified as phthalates, peak of $R_t = 28.46$ as oleanitrile, all retrieved in the control

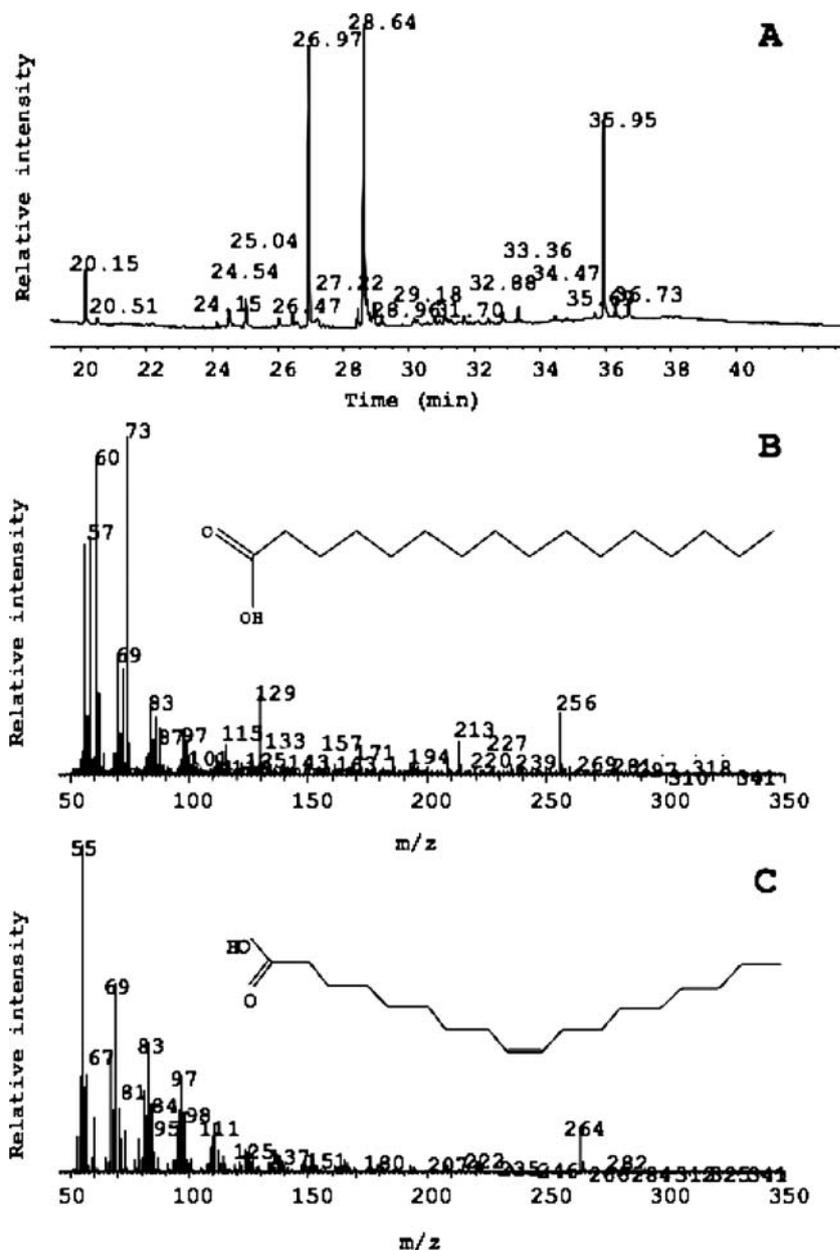


potential sites of post-translational modifications in the proteomic database www.expasy.org. The YinOYang server indicated only the possibility of *O*-*N*-acetylglucosinylation on Ser149, with a high score (0.67 with a threshold of 0.35). We, thus, performed a beta-elimination on the entire proteins (VEG1 and VEG2) electroblotted onto PVDF, and the presence of glycans was investigated by GC-MS. Ions of *m/z* 84, 102, and 318, typical of the peracetylated *O*-*N*-acetylglucosamine fragmentation (*O*-GlcNac, Fig. 4A) were searched and retrieved at the retention time of 31.58 min (Fig. 4B) in VEG1 chromatogram. No such ions were found in the VEG2 chromatogram. Standard *O*-GlcNac was injected in the same GC-MS conditions and eluted at a retention time of 31.50 min (data not shown). The mass

spectra of the experimental peak of R_t 31.58 and standard *O*-GlcNac were compared, and confirmed the presence of a *O*-GlcNac moiety on the protein (Fig. 4C). Peptide mapping on band 3 of the VNO (Fig. 5) revealed that the peptide sequence of OBP was covered at 100% (Table 2).

Identification of Binding Protein Ligands by GC-MS Bands corresponding to the two isoforms of VEG, and OBP were submitted to ligand extraction, the resulting supernatants were derivatized, and analyzed by GC-MS. The chromatogram of the VEG1 extraction displayed two major peaks of R_t 35.48 and 35.69 (Fig. 6A), whose mass spectra suggested steroids. No data were available for HFB derivatives in the NIST library, but the published analysis

Fig. 8 Characterization of pig OBP ligands. **A)** Total ion chromatogram of ligand extraction from band 3. **B)** Peak with $R_t = 26.97$ was identified as hexadecanoic acid by comparison with R_t and mass spectrum of the standard. **C)** Peak of $R_t = 28.64$ was identified as octadecenoic acid. Peaks of $R_t = 20.15$ min and of $R_t = 35.95$ corresponded to phthalates



of anabolic steroids of cattle, derivatized with HFBA (Daeseleire et al. 1998) indicated that the presence of four selected ions (m/z : 680, 467, 320, and 355) is typical of testosterone (Fig. 6B). Standard testosterone was derivatized and analyzed under the same conditions. Its mass spectrum (Fig. 6C) was identical to the mass spectrum of the compound with $R_t = 35.69$ (Fig. 6B). Since the mass spectrum of the compound with $R_t = 35.48$ was identical, we hypothesize that it corresponds to a testosterone isomer, dihydroxytestosterone, which is secreted together with testosterone, and is the biologically active steroid (see Discussion).

Analysis of the VEG2 ligands (Fig. 7A) showed several peaks of contaminants that also were retrieved in the control sample (oleanitrile and phthalates). We did not detect any steroid. Two fatty acid methyl esters were characterized (match of 100% with the NIST spectra), hexadecanoic acid methyl ester at $R_t = 25.71$ min (Fig. 7B), and octadecenoic acid methyl ester at $R_t = 29.67$ min (Fig. 7C).

The chromatogram of OBP ligand extraction showed four major peaks (Fig. 8A). The one at $R_t = 26.97$ was identified as palmitic acid (hexadecanoic acid, Fig. 8B) and the peak at $R_t = 28.64$ as oleic acid [(*Z*)-9-octadecenoic acid, Fig. 8C]. Two phthalates were identified at $R_t = 20.15$ and $R_t = 35.95$.

Binding Assay with Radiolabeled Analog of Testosterone The results reported above indicated that the chemical structure of ligands bound by VEG1 and VEG2 were different, suggesting a strong specificity in binding properties of the two VEG isoforms. The specific binding of VEG1 to progesterone and of VEG2 for fatty acids had already been demonstrated (Guiraudie et al. 2003). To validate these data, we performed a binding assay with tritiated testosterone, the endogenous ligand of VEG1, and progesterone, as a positive control (Fig. 9). As expected, testosterone was only bound by VEG1, whereas progesterone was strongly bound by VEG1 and weakly bound by VEG2 and OBP.

Discussion

We used HFBA derivatization to characterize the endogenous ligands of the porcine olfactory binding proteins (VEG isoforms and OBP) because it is a standard method for the GC and/or GC-MS analysis of steroid derivatives (e.g., Daeseleire et al. 1998). Because we did not purify the putative ligands, the samples contained some contaminants coming from electrophoresis sample buffer, principally Tris, sucrose, and also phthalates from Eppendorf tubes (polypropylene), which were easily identified by using EI detection in mass spectrometry (typical 149 ion). These contaminants did not interfere with the identification of the ligands.

We characterized the endogenous ligands of VEG isoforms and OBP from pig VNO, which endogenous ligands were able to displace in a binding assay (Guiraudie et al. 2003; this study). Our analysis showed that VEG2 and OBP ligands are fatty acids or their derivatives, already found in the human counterpart of VEG, the tear lipocalin (Redl 2000). These data also are in accordance with published results obtained from an in-gel binding assay, where VEG2 and OBP bound different fatty acids of the porcine maternal pheromone (Guiraudie et al. 2003). We also have demonstrated that the steroid progesterone was bound only by VEG1, suggesting a strong binding specificity for steroids. Indeed, we have identified the previously unknown natural ligand of VEG1 as testosterone, differing from progesterone by the substitution of an alcohol instead of a methyl-ketone on carbon 17. Testosterone is the major compound secreted by the testes and is metabolized into dihydrotestosterone, which is transported *via* the blood to the submaxillary gland (Babol et al. 1996) by binding to various proteins (sex hormone binding globulin and in a lesser extent, albumin). The expression of VEG is associated with glands and organs involved in sexual communication. Its high concentration in saliva, together with androstenone and androstenol, suggests a role in mating behavior of pigs that could be investigated by behavioral assays. In this context, VEG1 of the VNO has to be considered as a pheromone-binding protein [as is the case with SAL (Marchese et al. 1998; Loebel et al. 2000)]. The presence in the same compartment of both components involved in sexual communication and OBP has been documented in insects. In *Drosophila*, the fatty acid derivative *cis*-vaccenyl acetate is transferred from the male to the female during copulation bound to a CSP (Jallon et al. 1981; GenBank accession number U08281). In the Lepidoptera, CSPs are expressed in the pheromonal gland, at least to solubilize pheromone components, which are fatty acid derivatives (Jacquin-Joly et al. 2001).

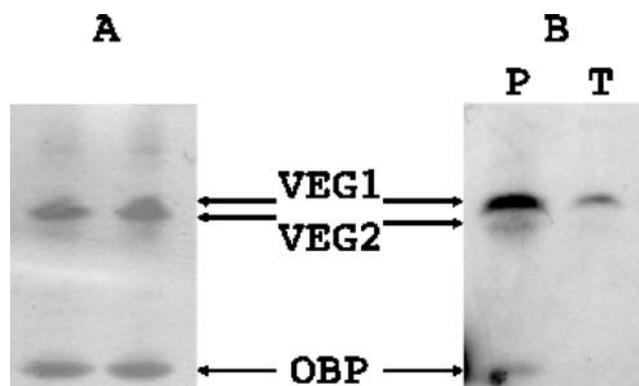


Fig. 9 In-gel binding assay between pig VNO extract and tritiated steroids. **A**) PVDF membrane stained with Ponceau red after electroblotting of VNO proteins. Position of VEG1, VEG2 and OBP is indicated. **B**) Fluorography after a 1-wk exposure, indicating the location of the radiolabeled progesterone (P) and testosterone (T)

As the only difference that we identified between VEG1 and VEG2 is the *O*-GlcNac moiety on VEG1, we assume that the binding specificity of VEG1 to steroids is linked to the presence of the *O*-GlcNac group on the protein. This result is unusual: indeed, the *O*-linked N-acetylglucosamylation of proteins is described as a nuclear and cytoplasmic modification (Torres and Hart 1984) and is not supposed to occur on secretory proteins, i.e., proteins synthesized *via* the endoplasmic reticulum, that bears a signal peptide as olfactory binding proteins. *O*-N-acetylglucosamylation and phosphorylation can occur on the same Ser and Thr residues in a reversible mechanism called YinOYang (Corner and Hart 2001). The enzyme responsible for the *O*-GlcNac linkage (*O*-GlcNac transferase, OGT) was not retrieved in the reticulum compartment (Hart et al. 2007). Although there is evidence for the phosphorylation of extracellular proteins by ectokinases (e.g., Nath et al. 2008), to date no protein localized in the extracellular pathway has been described to bear *O*-GlcNac residues. However, the linkage of *O*-GlcNac to an olfactory binding protein was already reported for hamster aphrodisin (Briand et al. 2000). This surprising result, however, was not discussed by these authors, despite the fact that two potential *O*-GlcNac sites (S58, T148) are predicted by the YinOYang server (SwissProt accession number Q9Z117). This unusual post-translational modification for secretory proteins could be a special feature of Bowman's gland secreting cells and the study of VEG1 biosynthesis pathway in such cells is currently ongoing.

Until now, the impact of post-translational modifications on the binding properties of OBPs (*sensu largo*) has not been fully investigated. The *O*-GlcNac modification creates several isoforms of OBPs, which possess different and specific binding affinities for pheromone components. The existence of such variants extends the possibility of coding for odorants by OBPs, and it suggests that the binding of odorants by OBPs is an initial discrimination step, preceding binding to olfactory receptors. This hypothesis is novel for the field of Mammalian olfaction where OBPs have been considered mainly as passive carriers of odorant molecules.

References

- BABOL, J., SQUIRES, E. J., and BONNEAU, M. 1996. Factors regulating the concentrations of 16-androstene steroids in submaxillary salivary glands of pigs. *J. Anim. Sci.* 74:413–419.
- BRIAND, L., HUET, J. C., PEREZ, V., LENOIR, G., NESPOULOUS, C., BOUCHER, Y., TROTIER, D., and PERNOLLET, J. C. 2000. Odorant and pheromone binding by aphrodisin, a hamster aphrodisiac protein. *FEBS Letters* 476:179–185.
- BRIAND, L., BLON, F., TROTIER, D., and PERNOLLET, J. C. 2004. Natural ligands of Hamster aphrodisin. *Chem. Senses* 29:425–430.
- BUROVA, T. V., RABESONA, H., CHOISET, Y., JANKOWSKI, C. K., SAWYER, L., and HAERTLE, T. 2000. Why has porcine VEG protein unusually high stability and suppressed binding ability? *Biochim. Biophys. Acta* 1478:267–279.
- CORNER, F. I. and HART, G. W. 2001. Reciprocity between *O*-GlcNac and *O*-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry* 40:7845–7852.
- DAL MONTE, M., ANDREINI, I., REVOLTELLA, R., and PELOSI, P. 1991. Purification and characterization of two odorant-binding proteins from nasal tissue of rabbit and pig. *Comp. Biochem. Physiol. B* 99:445–451.
- DAESELEIRE, E., VANDEPUTTE, R., and PETEGHEM, C. V. 1998. Validation of multi-residue methods for the detection of anabolic steroids by GC-MS in muscle and urine samples from cattle. *Analyst* 123:2595–2598.
- GARIBOTTI, M., CHRISTIANSEN, H., SCHMALE, H., and PELOSI, P. 1995. Porcine VEG proteins and tear prealbumins. *Chem. Senses* 20:69–76.
- GLASGOW, B. J., ABDURAGIMOV, A. R., FARAHBAKHSH, Z. T., FAULL, K. F., and HUBBELL, W. L. 1995. Tear lipocalins bind a broad array of lipid ligands. *Curr. Eye Res.* 14:363–372.
- GUIRAUDIE, G., PAGEAT, P., CAIN, A. H., MADEC, I., and NAGNAN-LE MEILLOUR, P. 2003. Functional characterization of olfactory binding proteins for appeasing compounds and molecular cloning in the vomeronasal organ of pre-pubertal pigs. *Chem. Senses* 28:609–619.
- GUIRAUDIE-CAPRAZ, G., SLOMIANNY, M. C., PAGEAT, P., MALOSSE, C., CAIN A. H., ORGEUR, P., and NAGNAN-LE MEILLOUR, P. 2005. Biochemical and chemical supports for a transnatal olfactory continuity through sow maternal fluids. *Chem. Senses* 30:241–251.
- HART, G. W., HOUSLEY, M. P., and SLAWSON, C. 2007. Cycling of *O*-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446:1017–1022.
- JACQUIN-JOLY, E., VOGT, R. G., FRANCOIS, M. C., and NAGNAN-LE MEILLOUR, P. 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses* 26:833–844.
- JALLON, J. M., ANTHONY, C., and BENAMAR, O. 1981. Un anti-aphrodisiaque produit par les males de *Drosophila melanogaster* et transféré aux femelles lors de la copulation. *C. R. Acad. Sci. Paris* 292:1147–1149. (in French).
- LOEBEL, D., SCALONI, A., PAOLINI, S., FINI, C., FERRARA, L., BREER, H., and PELOSI, P. 2000. Cloning, post-translational modifications, heterologous expression and ligand-binding of boar salivary lipocalin. *Biochem. J.* 350:369–379.
- MARCHESE, S., PES, D., SCALONI, A., CARBONE, V., and PELOSI, P. 1998. Lipocalins of boar salivary glands binding odours and pheromones. *Eur. J. Biochem.* 252:563–568.
- NAGNAN-LE MEILLOUR, P., LAGANT, P., CORNARD, J. P., BRIMAU, F., LE DANVIC, C., VERGOTEN, G., and MICHALSKI, J. C. 2009. Phenylalanine 35 and tyrosine 82 are involved in the uptake and release of ligand by porcine odorant binding protein. *Biochim. Biophys. Acta*. doi:10.1016/j.bbapap.2009.04.012.
- NATH, D., MAITI, A., and MAJUMDER, G. C. 2008. Cell surface phosphorylation by a novel ecto-protein kinase: a key regulator of cellular functions in spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 1778:153–165.
- ODA, Y., NAGASU, T., and CHAIT, B. T. 2001. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat. Biotechnol.* 19:379–382.
- PAOLINI, S., SCALONI, A., AMORESANO, A., MARCHESE, S., NAPOLITANO, E., and PELOSI, P. 1998. Amino acid sequence, post-translational modifications, binding and labelling of porcine odorant-binding protein. *Chem. Senses* 23:689–698.
- RAMONI, R., VINCENT, F., GROLLI, S., CONTI, V., MALOSSE, C., BOYER, F. D., NAGNAN-LE MEILLOUR, P., SPINELLI, S., CABBILLAU, C.,

- and TEGONI, M. 2001. The insect attractant 1-octen-3-ol is the natural ligand of the bovine odorant-binding protein. *J. Biol. Chem.* 276:7150–7155.
- REDL, B. 2000. Human tear lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta* 1482:241–248.
- ROBERTSON, D. H. L., BEYNON, R. J., and EVERSLED, R. P. 1993. Extraction, characterization and binding analysis of two pheromonally active ligands associated with major urinary protein of the house mouse (*Mus musculus*). *J. Chem. Ecol.* 19:1405–1416.
- SCALONI, A., PAOLINI, S., BRANDAZZA, A., FANTACCI, M., BOTTIGLIERI, C., MARCHESI, S., NAVARRINI, A., FINI, C., FERRARA, L., and PELOSI, P. 2001. Purification, cloning and characterisation of odorant- and pheromone-binding proteins from pig nasal epithelium. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:823–834.
- SINGER, A. G., MACRIDES, F., CLANCY, A. N., and AGOSTA, W. C. 1986. Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge. *J. Biol. Chem.* 28:13323–13326.
- TEGONI, M., PELOSI, P., VINCENT, F., SPINELLI, S., CAMPANACCI, V., GROLLI, S., RAMONI, R., and CABBILLAU, C. 2000. Mammalian odorant binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1482:229–240.
- TORRES, C. R. and HART, G. W. 1984. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNac. *J. Biol. Chem.* 259:3308–3317.
- XU, P., ATKINSON, R., JONES, D. N., and SMITH, D. P. 2005. *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron* 45:193–200.
- ZANETTA, J. P., TIMMERMAN, P., and LEROY, Y. 1999. Determination of constituents of sulphated proteoglycans using a methanolysis procedure and gas chromatography/mass spectrometry of heptafluorobutyrate derivatives. *Glycoconj. J.* 16:617–627.

Phosphorylation of Native Porcine Olfactory Binding Proteins

Patricia Nagnan-Le Meillour · Chrystelle Le Danvic ·
Fanny Brimau · Philippe Chemineau ·
Jean-Claude Michalski

Received: 19 February 2009 / Revised: 10 June 2009 / Accepted: 21 June 2009
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

Abstract The identification of various isoforms of olfactory binding proteins is of major importance to elucidate their involvement in detection of pheromones and other odors. Here, we report the characterization of the phosphorylation of OBP (odorant binding protein) and Von Ebner's gland protein (VEG) from the pig, *Sus scrofa*. After labeling with specific antibodies raised against the three types of phosphorylation (Ser, Thr, Tyr), the phosphate-modified residues were mapped by using the beta-elimination followed by Michael addition of dithiothreitol (BEMAD) method. Eleven phosphoryla-

tion sites were localized in the pOBP sequence and nine sites in the VEG sequence. OBPs are secreted by Bowman's gland cells in the extracellular mucus lining the nasal cavity. After tracking the secretion pathway in the rough endoplasmic reticulum of these cells, we hypothesize that these proteins may be phosphorylated by ectokinases that remain to be characterized. The existence of such a regulatory mechanism theoretically increases the number of OBP variants, and it suggests a more specific role for OBPs in odorant coding than the one of odorant solubilizer and transporter.

Chrystelle Le Danvic and Fanny Brimau contributed equally to the work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10886-009-9663-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Nagnan-Le Meillour (✉) · C. Le Danvic · F. Brimau
INRA, UMR 8576 CNRS/Université Lille1,
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle,
F-59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France
e-mail: patricia.le-meillour@univ-lille1.fr

C. Le Danvic
UNCEIA,
149, rue de Bercy,
F-75595 Paris, Cedex 12, France

F. Brimau · P. Chemineau
INRA, UMR 6175 INRA/CNRS/Université François
Rabelais/Haras Nationaux,
Physiologie de la Reproduction et des Comportements,
F-37380 Nouzilly, France

J.-C. Michalski
INSERM, UMR 8576 CNRS/Université Lille1,
Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle,
F-59655 Villeneuve d'Ascq, Cedex, France

Keywords BEMAD · MALDI-TOF mass spectrometry ·
Olfaction · Phosphorylation · Polyacrylamide gel
electrophoresis · Porcine odorant binding protein · Secretory
protein · Von Ebner's gland protein · Western blot

Introduction

Despite extensive studies of their structure and binding properties, the role of odorant binding proteins (OBPs) in the detection of odorant molecules still is not completely understood (Tegoni et al. 2000). These small soluble proteins are secreted in the mucus that lines the nasal cavity in mammals where olfactory receptor neurons are located. One major unresolved question about OBPs is their interaction with olfactory receptors, and the nature of the olfactory receptor ligands. Two major hypotheses have been proposed: 1) The ligand is the odorant molecule itself, solubilized and transported to the receptor by OBPs. In this scheme, the binding between odorant molecules and OBPs is unspecific, and this implication is supported by the low number of OBPs found in the mucosa of each animal species, and by their broad spectrum of binding of

hydrophobic molecules (Dal Monte et al. 1993; Herént et al. 1995). OBPs also are assumed to concentrate odorants and/or to scavenge them from receptors in a deactivation process (Pelosi 2001). 2) The ligand is the complex formed by the specific binding between a given odorant molecule and a specific OBP. This hypothesis involves a conformational change of the OBP upon ligand binding, which confers an “activated” form to the complex, able to interact with a specific receptor. It also implies that the number of OBPs should be higher than yet described. The micro diversity of OBPs has not been fully investigated. However, Paolini et al. (1998) reported that the porcine OBP is the major OBP of nasal mucosa, although perhaps not the only one. Microheterogeneity of OBPs related to primary structure differences has also been reported in porcupine (Ganni et al. 1997).

We have used a ligand-oriented approach to identify the proteins involved in the specific binding of pheromone components in the nasal mucosa of pre-pubertal pigs, *Sus scrofa* (Guiraudie et al. 2003). Three OBPs were identified as Salivary Lipocalin (SAL), Von Ebner’s gland protein (VEG), and porcine odorant binding protein (pOBP), by immunodetection with specific antibodies, peptide mapping, and cloning of the encoding cDNA. The binding assay, performed in non-denaturing conditions, revealed two isoforms of VEG, with different binding properties (Guiraudie et al. 2003). We have shown recently that the binding specificity of VEG1 isoform for steroids is governed by the presence of an *O*-GlcNac moiety on the protein (Le Danvic et al. 2009). Such a specificity of ligand binding, linked to OBPs isoforms, strongly favors the hypothesis that specific complexes could exist between odorants and OBPs. Furthermore, we observed that the purification of olfactory binding proteins by anion exchange HPLC provided several isoforms eluted at different NaCl concentrations, suggesting different charges coming from post-translational modifications (unpublished results). Here, we report the identification, characterization, and localization of post-translational modifications of porcine OBP and VEG.

Methods and Materials

Protein Extraction from Respiratory Mucosa Animals (Large White adult sows of *Sus scrofa*) were slaughtered in agreement with UE directives about animal welfare. Respiratory mucosa (RM) was dissected immediately after death and stored at -80°C . Native proteins were extracted from 10 mg of RM with 800 μl of 2:1 chloroform/methanol (v:v, Sigma-Aldrich, La Verpillière, France) on ice. After a brief homogenization by vortexing, the samples were centrifuged at $12,100\times g$ for 10 min at 4°C . The methanol

phase was dried under vacuum (Speed-Vac, Eppendorf, Le Pecq, France) and stored at -20°C until use.

Dephosphorylation Enzymatic Treatment RIPA buffer (150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5 mM DTT in 50 mM Tris/HCl pH=8.5) was added to protein samples and incubated 16 h at 37°C with 2 units of alkaline phosphatase (rAPid alkaline phosphatase, Roche Diagnostics, Meylan, France) for 10 μg of total protein.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) and Western Blotting Samples were analyzed by 16.8% PAGE gels in denaturing and reducing conditions (SDS-PAGE) as previously described (Guiraudie et al. 2003; Nagnan-Le Meillour et al. 2009). Gel staining (overnight in Coomassie blue R solution) and Western blotting were performed as described in Guiraudie et al. (2003), except that for the Western blot, membranes were saturated with 5% non-fatty milk before incubation with anti-pOBP and -VEG antibodies, or with 3% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) for anti-phosphorylation antibodies. Rabbit polyclonal antibodies anti-phosphoserine, anti-phosphothreonine, and anti-phosphotyrosine were used at 1:500, 1:500, and 1:2,000 dilutions, respectively, following recommendations of the manufacturer (Zymed laboratories, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Rabbit polyclonal antibodies were raised in our laboratory against recombinant purified pOBP (Nagnan-Le Meillour et al. 2009). They were used at a 1/20,000 dilution, and rabbit polyclonal anti-VEG antibodies at a 1/10,000 dilution (provided by Professor Paolo Pelosi). Membranes then were incubated with secondary antibodies at a 1:50,000 dilution (anti-rabbit horseradish peroxidase-labeled antibodies, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Templemars, France). Detection was carried out with ECL Plus Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences).

Characterization of Native Proteins by In-gel Digest, Peptide Extraction and MALDI-TOF MS Analysis Band slices containing pOBP and VEG were treated as previously described (Nagnan-Le Meillour et al. 2009), with Trypsin Gold (Mass Spectrometry grade, Promega, Charbonnières, France, 10 ng/ μl). Peptides resulting from the trypsin digestion were extracted with two incubations in 45% acetonitrile in 10% formic acid at 30°C for 15 min, followed by an incubation in 95% acetonitrile in 5% formic acid at room temperature (RT) for 15 min. The extracts were dried under vacuum and solubilized in 5 μl of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) before desalting and concentration on a C18 column (Vivapure C18, microspin columns, Sartorius, Palaiseau, France). Peptides were eluted with different percentages of acetonitrile (12.5, 25, 50, and 80%) directly into the matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich) prepared at a concentration of 10 mg/ml in

50% acetonitrile, 0.1% TFA, and were analyzed on a Voyager DE Pro MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The instrument was used in reflector mode, measuring peptide masses in a range of 500 to 4,000 Da. Calibration points were based on the masses of the matrix cluster or trypsin autolysis products (m/z 842, 2211). Protein identification was performed by comparison of measured peptide masses with the theoretical porcine OBP (GenBank accession number NP_998961) and VEG (S77587) peptide maps (<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

Mapping Phosphorylation Sites in Proteins As a first approach, the NetPhos server at <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> (Blom et al. 1999) was used to predict potential phosphorylation sites in pOBP and VEG sequences. The sites of phosphorylation were experimentally determined by using a method involving mild β -elimination followed by Michael addition of dithiothreitol (BEMAD) adapted from Wells et al. (2002). Proteins were extracted and treated as they were for peptide mapping (above), except that they were not reduced and alkylated before treatment with trypsin, to avoid the addition of DTT on cysteines. Peptides resulting from trypsin digestion were suspended in 50 mM Tris/HCl containing 1 mM MgCl₂ and alkaline phosphatase (1 U/10 μ l). The reaction was incubated overnight at 37°C, then dried in a speed-vac. Dried peptides were β -eliminated and subjected to Michael addition with DTT by resuspension in 200 μ l of BEMAD solution (1% triethylamine, 0.1% NaOH, 20% ethanol, 10 mM DTT) and incubated at 50°C for 2.5 h. The reaction was stopped by addition of TFA to a 1% final concentration. Peptides were cleaned up via reverse-phase Vivapure C-18 micro columns (Sartorius) with different acetonitrile percentages in 0.1% TFA (12.5, 25, 50, and 80%) and dried. DTT modified peptides were enriched by thiol affinity chromatography according to Whelan and Hart (2006). Thiopropyl Sepharose 6B resin (Amersham Biosciences) was swelled and washed in column buffer containing 150 mM NaCl and 1 mM EDTA in 20 mM Tris/HCl, pH 7.6 (TBS/EDTA). The resin was transferred into a Vivaclear Mini Clarifying filter (Sartorius) and washed with 7 ml of TBS/EDTA by centrifugation. Peptides were resuspended in 200 μ l TBS/EDTA and loaded onto the thiol column for 4 h at RT by rotation. The column then was washed with 15 ml of TBS/EDTA, and peptides were eluted by three washes of 150 μ l TBS/EDTA containing 20 mM of free DTT. They were acidified by 0.1% TFA and cleaned up with reverse phase Vivapure C-18 Micro spin columns (Sartorius). Peptides were eluted directly into the matrix (10 mg/ml of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 0.1% TFA, 50% acetonitrile) and analyzed by MALDI-TOF MS as above.

Results and Discussion

Heterogeneity of Porcine OBP and VEG The respiratory mucosa (RM) extracts were submitted to electrophoresis in native (Fig. 1A) or denaturing conditions (Fig. 1B), and the respective positions of pOBP and VEG were determined by peptide mapping. Both spectra (Fig. 2) and reconstituted maps (Table 1) indicated that the two proteins co-migrate in the same band in denaturing conditions (Fig. 1B). This result is in accordance with the calculated molecular weights of the proteins (17,935 Da for pOBP and 17,441 Da for VEG) and with previous data obtained by using the same electrophoresis conditions for pOBP (Nagnan-Le Meillour et al. 2009). Each peptide could be assigned unambiguously to one or the other protein, as none of them was found to be common to pOBP and VEG (Table 1). After electrophoresis in native conditions, pOBP and VEG displayed reproducible heterogeneity (Fig. 1A), which was not detected under reducing and denaturing conditions of SDS-PAGE (Fig. 1B). These different forms can result from different global charges, due to post-translational modifications, such as phosphorylation on Ser, Thr, and Tyr residues. The NetPhos server (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/) indicated that several sites in the primary structure could potentially be phosphorylated: Ser13, Ser24, Ser41, Ser67, Tyr78, and Tyr82 in pOBP, and Ser24, Ser35, Ser149, Thr23, and Tyr97, in VEG. We, thus, performed Western blotting with commercial specific antibodies, raised against the three types of phosphorylation, to test the hypothesis that both proteins are phosphorylated.

Immunodetection of Phosphorylations with Specific Antibodies Preliminary experiments were run under native conditions, where the diversity of binding proteins is the

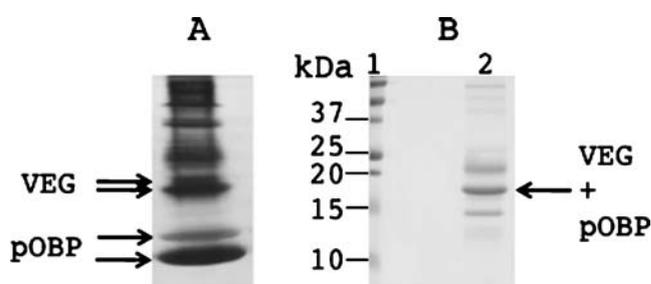
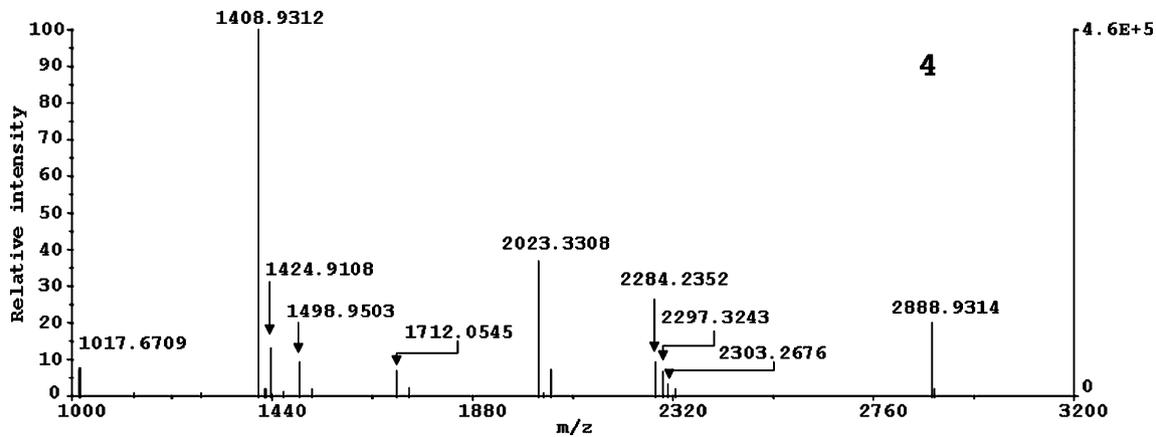
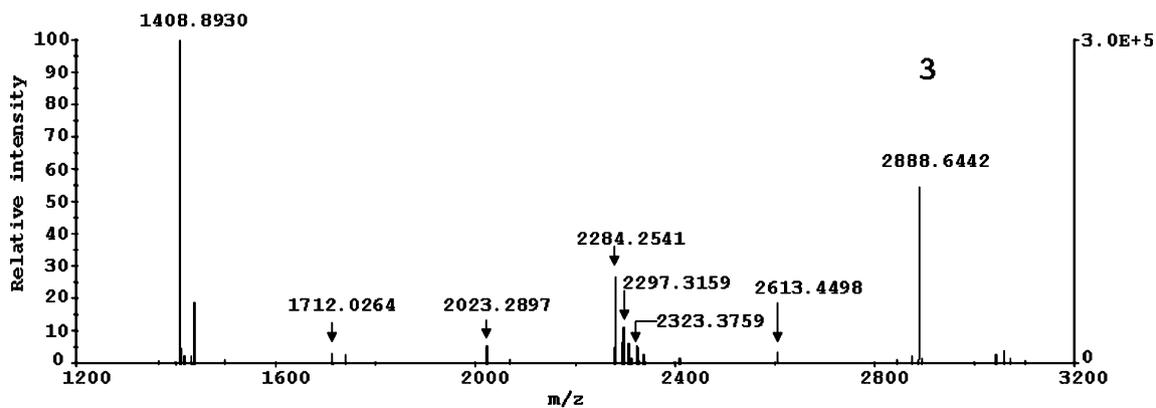
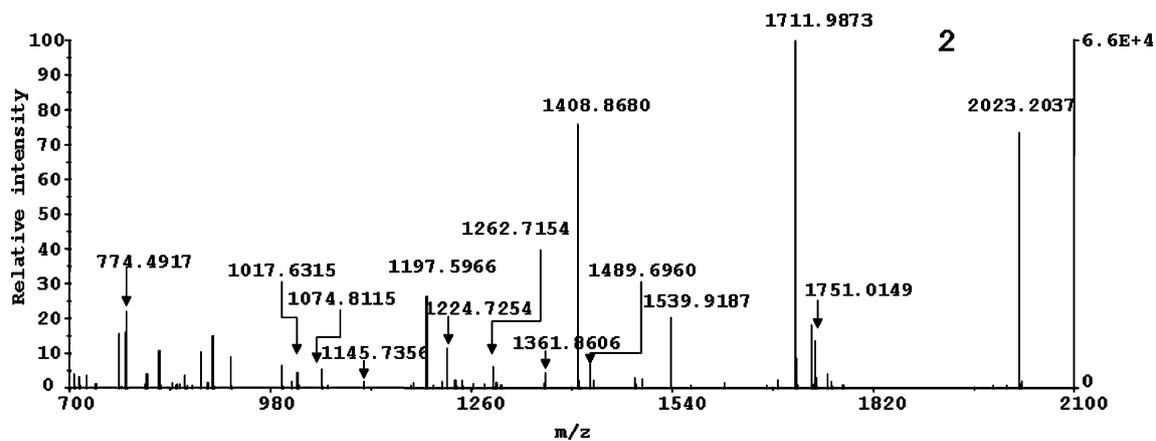
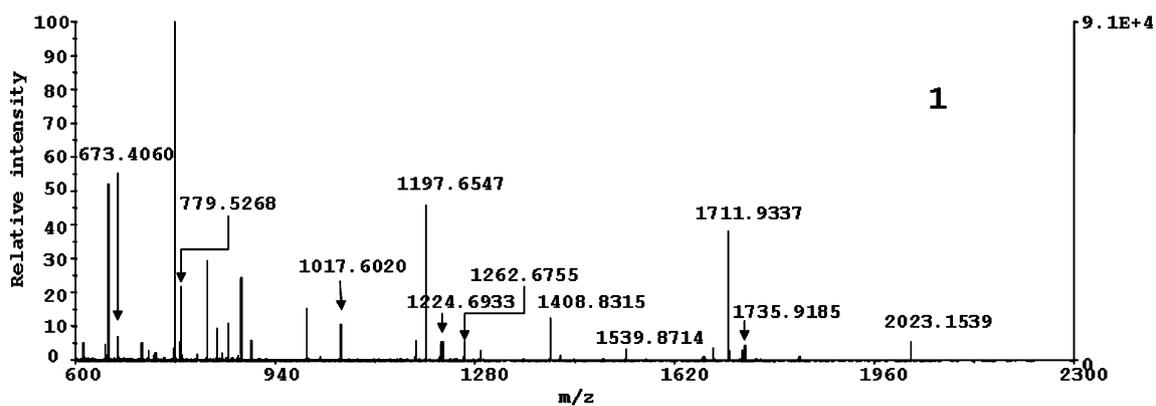


Fig. 1 Separation of protein extracts of pig, *Sus scrofa*, respiratory mucosa (RM) tissue: **A** Native-PAGE and **B** SDS-PAGE. 1: Molecular weight markers in kilodaltons (kDa, Precision plus Protein All Blue, Bio-Rad), 2: RM extract. Coomassie blue staining (16.8% acrylamide). The position of VEG and pOBP, deduced from the peptide mapping analysis, is indicated by the arrow. Note that the quantity of sample in native-PAGE is 20-fold higher than that loaded in the SDS-PAGE gel (same quantity as used in the Western blot experiments after SDS-PAGE)



◀ **Fig. 2** Monoisotopic mass spectra from MALDI-TOF MS analysis of reduced and carboxymethylated band slice containing pOBP and VEG (SDS-PAGE) of the pig, *Sus scrofa*, respiratory mucosa (RM) extract after trypsin digestion (untreated sample). Peptides were eluted with different percentages of acetonitrile: 12.5% (1), 25% (2), 50% (3), and 80% (4)

most detectable. Unfortunately, phosphate groups often are buried into the folded protein and unreachable by antibodies. As expected, under these conditions, the Western blot with the three antibodies was negative. A Western blot then was performed after SDS-PAGE, and the band containing the two co-migrating proteins (Fig. 3A) was labeled by antiphosphoserine (Fig. 3B), antiphosphotyrosine (Fig. 3C), but not by antiphosphothreonine, which is consistent with the prediction of the NetPhos server of only one potential phosphorylation site on VEG Thr23. To verify the accuracy of the labeling, half of the RM sample was treated with alkaline phosphatase (AP) to remove any phosphate group, and both treated and untreated samples were submitted to Western blot analysis with the three specific antibodies. With antiphosphoserine antibodies, we observed a significant reduction of the signal after AP treatment (Fig. 4A), unless a total knock out. We obtained the same results with antiphosphotyrosine antibodies (data not shown). In both cases, we checked for the presence of pOBP and VEG after treatment by Western blot with anti-pOBP and anti-VEG antibodies (Fig. 4B and C, respective-

Table 1 MALDI-TOF MS analysis of peptides obtained after trypsin digestion of a reduced and carboxymethylated band slice containing pOBP and VEG from extracts of pig, *Sus scrofa*, respiratory mucosa (RM) tissue

Modifications	Theoretical mass (Da)[M + H] ⁺	Peptide	Measured mass [M + H] ⁺			
			Untreated	Treated with AP		
PYRR ^a :1	1711.7809	pOBP				
		1–15	1711.9337 (1 ^b)	1711.8192 (2)		
		16–28	1498.9503 (4)	1498.8287 (3)		
		16–40	2888.6442 (3)			
		29–40	1408.8315 (1)	1408.7765 (1)		
		41–50	1197.5966 (2)	1197.7011 (2)		
		48–58	1361.8606 (2)	1361.7923 (2)		
		51–58	1017.6315 (2)	1017.5799 (2)		
		59–72	1539.9187 (2)	1539.9068 (2)		
		88–111	2613.4498 (3)	2613.4177 (3)		
		121–131	1262.7154 (2)			
		121–133		1537.7380 (3)		
		121–137	2023.1539 (1)	2023.1215 (2)		
		132–137	779.5268 (1)			
		138–157		2240.3284 (3)		
Cys_CAM ^c :155	2297.0714	138–157	2297.3159 (3)			
PYRR ^a :1	1750.9122	VEG				
		1–16	1751.0149 (2)	1750.9928 (2)		
		17–31	1735.9185 (1)	1735.9633 (2)		
		21–31		1145.6059 (3)		
		32–42	1224.6933 (1)	1224.9781 (1)		
		70–83		1617.9495 (2)		
		71–83	1489.6960 (2)			
		84–92	1074.8115 (2)	1074.7407 (2)		
		85–94	1145.7356 (2)	1145.7576 (2)		
		93–111		2266.1321 (2)		
		Cys_CAM ^c :101	2323.1023	93–111	2323.3759 (3)	
			774.4654	112–118	774.4917 (2)	774.5959 (2)
		MSO ^d :112	2303.1336	112–131	2303.2676 (4)	
			1986.9403	119–135		1987.3511 (2)
			673.3991	132–137	673.4060 (1)	
	2284.1350	136–157	2284.2541 (3)	2284.3648 (3)		

^a PYRR: pyrrolidone carboxylic acid

^b Peptides were eluted and recovered at different percentages of acetonitrile: (1) 12.5%, (2) 25%, (3) 50%, (4) 80% (cf. spectra in Fig. 2)

^c Cys_CAM: carbamidomethyl-cysteine

^d MSO: methionine sulfoxide

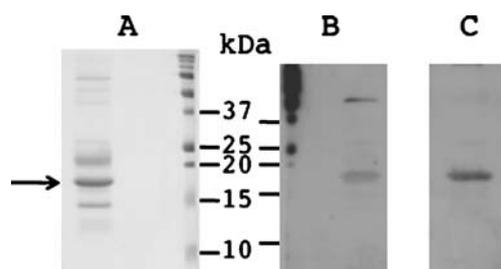


Fig. 3 Immunodetection of phosphorylated proteins in respiratory mucosa (RM) samples of the pig, *Sus scrofa*, by Western blot and ECL Plus detection. **A** Coomassie blue staining of the same sample as used for Western blot analysis. Arrow indicates the band containing pOBP and VEG. **B** antiphosphoserine antibodies (1:500 dilution, 2 min exposure). **C** antiphosphotyrosine antibodies (1:2,000 dilution, 2 min exposure). Discrepancy between relative positions of molecular weight markers in A and B/C comes from the swelling of the gel (A) in water

ly). The corresponding band was cut from a SDS-PAGE gel run under the same conditions, and it was submitted to peptide mapping. The use of different percentages of acetonitrile allowed elution of most of the expected peptides. Indeed, the VEG sequence was recovered at 84.1%, and the pOBP one at 84.7% with or without AP treatment, indicating that the proteins were not degraded by the dephosphorylation (Table 1). These data indicated that one of the two proteins, or both, are phosphorylated.

Mapping of Phosphorylation Sites in pOBP and VEG Experiments described above did not permit us to conclude whether one or both proteins are phosphorylated. Thus, the sites were located in proteins experimentally by the BEMAD method followed by MALDI-TOF MS analysis. In MALDI-TOF MS, the *O*-linked phosphate groups are labile and decayed by the laser during desorption of peptides from the matrix (Mann et al. 2002). The use of beta-elimination of phosphate from Ser, Thr, and Tyr residues by alkaline phosphatase, followed by the attack of the nucleophile DTT confers a tag of defined molecular mass (136.2 Da) to the peptides bearing phosphate groups,

that are subsequently enriched by the use of thiol columns. The band slice containing pOBP and VEG was submitted to enzymatic digestion and BEMAD modification. The measured masses of resulting peptides were compared to a theoretical list of potential DTT-modified peptides calculated from the pOBP and VEG protein sequences (Table 2). Two different enzymes (Trypsin-T or Chymotrypsin-CT or both) were used for the site analysis. When using either T or CT, many ambiguous sites remained, and it was necessary to perform T and CT treatments successively to obtain the pOBP and VEG phosphorylation sites. Mass spectral analysis of peptides eluted with 50% acetonitrile after T + CT treatment, BEMAD and thiol column enrichment, revealed that in addition to DTT-modified peptides (Table 2), some unmodified peptides, typical of the pOBP and VEG digestion were present (Fig. 5). Five peptides resulted from the pOBP digestion with T + CT (mass 655.3903 corresponding to peptide 51–55), or T (mass 2224.0593, peptide 134–152; mass 2239.8924, peptide 138–157, and mass 2296.9473, peptide 138–157 with Cys_CAM:155) and VEG digestion with T (mass 2265.9512, peptide 93–111). The ratio between DTT-modified and unmodified peaks could not be determined, as the modified peptides were enriched by the use of thiol columns. We suggest that phosphorylated peptides are present in small quantities in the RM extracts, as the unmodified peaks are much more abundant than modified ones, even after enrichment (e.g., mass 2224.0593). The other DTT-modified peptides (Table 2), were obtained with other acetonitrile percentages (12.5, 25, and 80%) and different enzymatic treatment (T or CT). The corresponding spectra are provided in [Supplementary data](#).

In pOBP, the phosphorylation of the following residues was predicted by the NetPhos software: Ser13, Ser24, Ser41, Ser 67, and Tyr82 (Ser24, Ser149, Tyr97, and Thr23 in VEG), whereas Ser23, Ser49, Ser57, Tyr52, Thr71, and Thr122 were not predicted (Ser91, Ser153, Thr54, Thr151, and Tyr87 in VEG). The occurrence of masses indicating the phosphorylation of one or more residues in the same

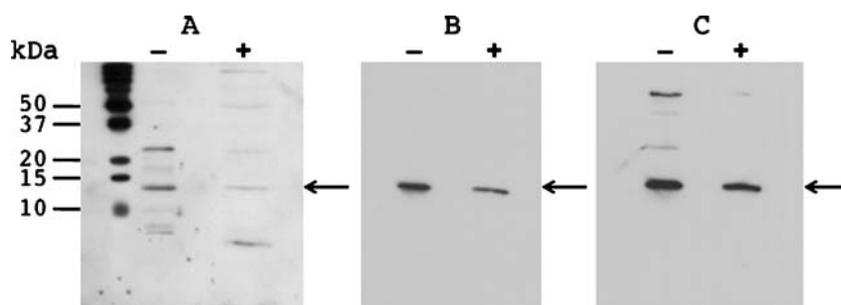


Fig. 4 Analysis of alkaline phosphatase action by Western blot and ECL Plus detection. **A** antiphosphoserine antibodies (1:500 dilution, 2 min exposure). **B** anti-pOBP antibodies (1:20,000 dilution, 15 sec exposure).

C anti-VEG antibodies (1:10,000 dilution, 15 sec exposure). (–) untreated sample, (+) treated sample, kDa molecular weight markers. Arrows indicate the band containing VEG and pOBP in each experiment

Table 2 BEMAD performed on SDS-PAGE band containing pOBP and VEG from pig, *Sus scrofa*, respiratory mucosa tissue, identifies the sites of phosphorylation

Calculated mass (Da)			Measured mass ⁺	Peptide	Peptide sequence
No DTT	1 DTT	2 DTT			
pOBP					
533.2929	669.4929		669.3701 (T + CT; 50%)	11–15	ELS(*)GK
1312.6691	1448.8631		1448.7923 (T + CT; 50%)	17–28	ITSY(°)IGS(°)S(°)DLEK
848.4360		1120.8360	1120.6106 (T + CT; 25%)	21–28	IGS(*)S(*)DLEK
1950.9807	2087.1807		2086.9766 (CT; 25%)	21–38	IGS(°)S(°)DLEKIGENAPFQVF
1950.9807		2223.3807	2223.2450 (CT; 50%)	21–38	IGS(*)S(*)DLEKIGENAPFQVF
1140.5354	1276.7354		1276.6478 (T + CT; 50%)	39–47	MRS(*)IEFDDK
1197.5633	1333.7633		1333.6166 (T; 50%)	41–50	S(°)IEFDDKES(°)K
1197.5633		1469.9633	1469.8707 (T; 25%)	41–50	S(*)IEFDDKES(*)K
1357.6634		1630.0634	1630.4646 (CT; 25%)	45–55	DDKES(*)KVY(*)LNF
1302.5670	1438.7670		1438.5673 (CT; 50%)	56–66	FS(*)KENGICEEF
1539.7359	1675.9359		1675.9154 (T; 25%)	59–72	ENGICEEFS(°)LIGT(°)K
994.4588	1130.6588		1130.6098 (T + CT; 25%)	79–87	DVNY(*)AGNNK
1262.5746	1398.7746		1398.5740 (T; 25%)	121–131	GT(*)DIEDQDLEK
VEG					
1161.5456	1297.7456		1297.5331 (T; 50%)	21–31	AMT(°)S(°)DPEIPGK
1145.5507		1417.9507	1417.8547 (T; 25%)	21–31	AMT(*)S(*)DPEIPGK
1491.7689	1627.9689		1627.8242 (CT; 25%)	42–55	KALEGGDLEAQIT(*)F
536.3191	672.5191		672.3927 (T + CT; 50%)	84–87	RVVY(*)
557.3657	693.5657		693.4520 (T + CT; 25%)	88–92	ILPS(*)K
1199.6782		1472.0782	1472.0198 (CT; 50%)	88–97	ILPS(*)KVKDHY(*)
661.3304	797.5304		797.3954 (T + CT; 25%)	93–97	VKDHY(*)
2085.0029	2221.2029		2221.1589 (T; 50%)	138–157	GLNLDIRVPPQSS(°)ET(°)CS(°)PGGN

⁺ Shown are the peptides derived from analysis after enrichment by thiol chromatography (trypsin-T or chymotrypsin-CT or trypsin + chymotrypsin, T + CT) and elution at different percentages of acetonitrile: 12.5, 25, 50, and 80%. The corresponding spectra are shown in Fig. 5 (T + CT, 50%), supplementary Fig. 1 (CT, 25 and 50%), supplementary Fig. 2 (T + CT, 25%), and supplementary Fig. 3 (T, 25 and 50%)

* following Ser, Tyr, or Thr denotes mass addition at that site of 136.2 Da, indicating modification by DTT

° following Ser, Tyr, and Thr residues indicates a potential phosphorylation

peptide (21–38 and 41–50 in pOBP, 21–31 and 140–157 in VEG) suggests that several isoforms of phosphorylation co-exist for each protein. Finally, despite the combined use of two enzymes, the phosphorylation sites of peptides 59–72 in pOBP (Ser67 or Thr71) and 140–157 in VEG (Ser149 or Ser153 or Thr151) remained ambiguous. We considered the use other enzymes or chemical methods (CNBr) to assign the phosphorylation to one or the other residue, but none of these methods was suitable, as the theoretically generated peptides still contain all of the potentially phosphorylated residues. The sites could be determined by site-directed mutagenesis followed by heterologous expression in eukaryotic cells (Nagnan-Le Meillour et al. 2009), and by site mapping with the BEMAD method.

Phosphorylation of Extracellular Proteins This work demonstrated that two olfactory binding proteins (pOBP and

VEG) are phosphorylated, which is a novel and unexpected result. Indeed, pOBP and VEG are secreted in the nasal mucus by the exocrine Bowman's glands via the secretion pathway. This pathway occurs in the rough endoplasmic reticulum (RER) where the signal peptide permits the translocation of proteins through the RER membrane to be processed and secreted. Thus, hypothetically these proteins are not exposed to nuclear and cytoplasmic kinases and phosphatases involved in the phosphorylation/dephosphorylation of cellular proteins. However, Jordan et al. (1994) and others have provided evidence for the existence of extracellular enzymes (ecto-enzymes) located in the extracellular space. In particular, the occurrence of ectokinases and ecto-phosphatases has been demonstrated in various cell types, i.e., in goat spermatozoa where they modulate sperm motility (Nath et al. 2008). Such enzymes could be responsible for the phosphorylation of OBPs after

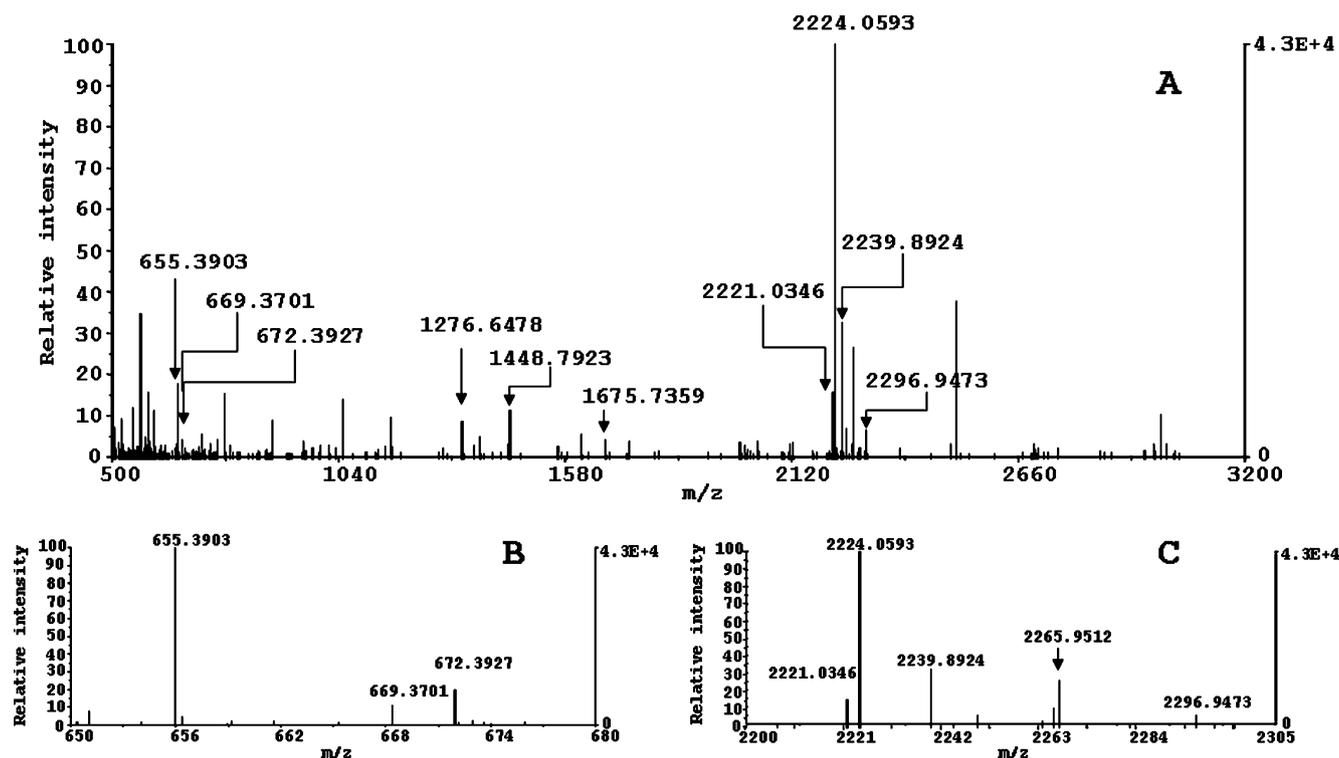


Fig. 5 Monoisotopic mass spectrum of MALDI-TOF MS analysis of carboxymethylated band containing pOBP and VEG (SDS-PAGE) of the pig, *Sus scrofa*, respiratory mucosa (RM) extract after BEMAD. **A** Peptides elution with acetonitrile 50%, after T + CT treatment. **B** Magnification of the 650–680 m/z zone. **C** Magnification of the 2,200–

2,300 m/z zone. The following peaks correspond to unmodified peptides generated by the digestion of proteins: OBP (T)- 138–157 (m/z =2239.8924), 138–157 Cys_CAM:155 (m/z =2296.9473), and 134–152 (m/z =2224.0593). OBP (C + CT) 51–55 (m/z =655.3903). VEG (T)- 93–111 (m/z =2265.9512). DTT-modified peptides are listed in Table 2

their extracellular secretion. Hypothetically, ecto-enzymes may have the potential for intercellular regulation or reception and transduction of external stimuli. Phosphorylation is a dynamic, reversible mechanism that results in a conformational change in the structure of many enzymes and receptors, causing them to become activated or deactivated. Accordingly, the phosphorylation of pOBP and VEG creates a variety of isoforms that could possess different and specific affinities for pheromones or other odors. We recently have demonstrated that the binding specificity of the VEG1 isoform of the pig vomeronasal organ for steroids is governed by the linkage of an *O*-GlcNac moiety on the protein (Le Danvic et al. 2009). The same result was obtained with the RM tissue (data not shown). *O*-N-acetylglucosamylation and *O*-phosphorylation can occur on the same protein and, in several instances, they map to the same (YinOYang) or adjacent sites (Comer and Hart 2000). In any case, the two modifications are dynamic and reversible, and increase the number of possible combinations for isoforms. Interestingly, Ser149 in VEG, which is phosphorylated, is also predicted by the YinOYang server (at www.expasy.org) to be *O*-GlcNac-

modified. We plan to map the *O*-GlcNac sites on VEG molecules, but the results will be much more difficult to obtain than for phosphorylation, as the sub-population of glycosylated VEG is probably a minor part of the entire population. Enrichment by using affinity columns with anti-*O*-GlcNac antibody will be necessary prior to BEMAD treatment.

The existence of such variants extends the possibility of odorant coding by OBPs, strongly suggesting that this interaction is the first discrimination step, prior to the binding with olfactory receptors. The possibility of regulation of pOBP and VEG binding properties by phosphorylation and glycosylation opens new ways to study their role in perireceptor events in olfaction, as well as their genesis via biosynthesis as secreted proteins in exocrine glands.

Acknowledgments We warmly thank Dr Frédéric Lévy for his skillful dissection of pig RM, and Professor Paolo Pelosi for his kind gift of anti-VEG antibodies. We are also grateful to Michael Thant and Djamel Abderrahmani for their contribution to preliminary experiments. We thank two anonymous referees and Dr. S.J. Seybold for their help to improve the manuscript.

References

- BLOM, N., GAMMELTOFT, S., and BRUNAK, S. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294:1351–1362.
- COMER, F. I. and HART, G. W. 2000. O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNac and O-phosphate. *J. Biol. Chem.* 275:29179–29182.
- DAL MONTE, M., CENTINI, M., ANSELMINI, C., and PELOSI, P. 1993. Binding of selected odorants to bovine and porcine odorant-binding proteins. *Chem. Senses* 18:713–721.
- GANNI, M., GARIBOTTI, M., SCALONI, A., PUCCI, P., and PELOSI, P. 1997. Microheterogeneity of odorant-binding proteins in the porcupine revealed by N-terminal sequencing and mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B:287–291.
- GUIRAUDIE, G., PAGEAT, P., CAIN, A. H., MADEC, I., and NAGNAN-LE MEILLOUR, P. 2003. Functional characterization of olfactory binding proteins for pig appeasing compounds and molecular cloning in the vomeronasal organ of pre-pubertal pigs. *Chem. Senses* 28:609–619.
- HÉRENT, M. F., COLLIN, S., and PELOSI, P. 1995. Affinities of nutty and green-smelling compounds to odorant-binding proteins. *Chem. Senses* 20:601–610.
- JORDAN, P., HEID, H., KINZEL, V., and KUBLER, D. 1994. Major cell surface-located protein substrates of an ecto-protein kinase are homologs of known nuclear proteins. *Biochemistry* 33:14696–14706.
- LE DANVIC, C., GUIRAUDIE-CAPRAZ, G., ABDERRAHMANI, D., ZANETTA, J. P., and NAGNAN-LE MEILLOUR, P. 2009. Natural ligands of porcine olfactory binding proteins. *J. Chem. Ecol.* In press (doi: 10.1007/s10886-009-9645-1)
- MANN, M., ONG, S. E., GRONBORG, M., STEEN, H., JENSEN, O. N., and PANDEY, A. 2002. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *TRENDS Biotechnol.* 20:261–268.
- NAGNAN-LE MEILLOUR, P., LAGANT, P., CORNARD, J. P., BRIMAU, F., LE DANVIC, C., VERGOTEN, G., and MICHALSKI, J. C. 2009. Phenylalanine 35 and tyrosine 82 are involved in the uptake and release of ligand by porcine odorant binding protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1794:1142–1150. (doi: 10.1016/j.bbapap.2009.04.012)
- NATH, D., MAITI, A., and MAJUMDER, G. C. 2008. Cell surface phosphorylation by a novel ecto-protein kinase: a key regulator of cellular functions in spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta* 1778:153–165.
- PAOLINI, S., SCALONI, A., AMORESANO, A., MARCHESE, S., NAPOLITANO, E., and PELOSI, P. 1998. Amino acid sequence, post-translational modifications, binding and labelling of porcine odorant-binding protein. *Chem. Senses* 23:689–698.
- PELOSI, P. 2001 The role of perireceptor events in vertebrate olfaction. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:503–509.
- TEGONI, M., PELOSI, P., VINCENT, F., SPINELLI, S., CAMPANACCI, V., GROLLI, S., RAMONI, R., and CABBILLAU, C. 2000. Mammalian odorant binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1482:229–240.
- WELLS, L., VOSSELER, K., COLE, R. N., CRONSHAW, J. M., MATUNIS, M. J., and HART, G. W. 2002. Mapping sites of O-GlcNac modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol. Cell. Proteomics* 1:791–804.
- WHELAN, S. A. and HART, G. W. 2006. Identification of O-GlcNac sites on proteins. *Methods Enzymol.* 415:113–133.

Références Bibliographiques

-
- Achiraman S & Archunan G (2002a)** *Characterization of urinary volatiles in Swiss male mice (Mus musculus): bioassay of identified compounds*, J Biosci, 27 (7), 679-686.
- Achiraman S & Archunan G (2002b)** *Urinary proteins and pheromonal communication in mammals*, Indian J Exp Biol., 40 (9), 1077-1080.
- Achiraman S & Archunan G (2006)** *1-Iodo-2-methylundecane, a putative estrus-specific urinary chemo-signal of female mouse (Mus musculus)*, Theriogenology, 66 (8), 1913-1920.
- Andersen KF & Vulpius T (1999)** *Urinary volatile constituents of the lion, Panthera leo*, Chem Senses, 24 (2), 179-189.
- Akerstrom B, Flower DR & salier JP (2000)** *Lipocalines: unity in diversity*, Biochem. Biophys. Acta, 1482, 1-8.

-
- Barbier M & Pain J (1960)** *Study of the secretion of the mandibular glands of the queens and workers of bees (Apis mellifica) by gas phase chromatography*, C R Acad Sci, 250, 3740-3742.
- Beynon RJ, Veggerby C, Payne CE, Robertson DH, Gaskell SJ, Humphries RE & Hurst JL (2002)** *Polymorphism in major urinary proteins: molecular heterogeneity in a wild mouse population*, J Chem Ecol, 28 (7), 1429-1446.
- Bianchet MA, Bains G, Pelosi P, Pevsner J, Snyder SH, Monaco HL & Amzel LM (1996)** *The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition*, Nature Struct Biol, 3, 934-939.
- Bignetti E, Cavaggioni A, Pelosi P, Persaud KC, Sorbi RT & Tirindelli R (1985)** *Purification and characterisation of an odorant-binding protein from cow nasal tissue*, Eur J Biochem, 149, 227-231.
- Blanchard V, Gadkari RA, George AV, Roy S, Gerwig GJ, Leeftang BR, Dighe RR, Boelens R & Kamerling JP (2008)** *High-level expression of biologically active glycoprotein hormones in Pichia pastoris strains--selection of strain GS115, and not X-33, for the production of biologically active N-glycosylated 15N-labeled phCG*, Glycoconj J, 25 (3), 245-257.
- Bourque D, Bisailon JG, Beaudet R, Sylvestre M, Ishaque M & Morin A (1987)** *Microbiological Degradation of Malodorous Substances of Swine Waste under Aerobic Conditions*, Appl Environ Microbiol, 53 (1), 137-141.
- Brennan PA & Keverne EB (2004)** *Something in the air? New insights into mammalian pheromones*, Curr Biol, 14 (2), 81-89.
- Briand L, Blon F, Trotier D & Pernollet JC (2004)** *Natural ligands of hamster aphrodisin*, Chem Senses, 29 (5), 425-430.
- Briand L, Trotier D & Pernollet JC (2004)** *Aphrodisin, an aphrodisiac lipocalin secreted in hamster vaginal secretions*, Peptides, 25 (9), 1545-1552.

- Briand L**, Huet JC, Perez V, Lenoir G, Nespoulous C, Boucher Y, Trotier D & Pernollet JC (2000) *Odorant and pheromone binding by aphrodisin, a hamster aphrodisiac protein*, FEBS Lett, 476, 179-185.
- Brossut R** (1996) *Phéromones : la communication chimique chez les animaux*, Edition CNRS Belin.
- Buck L & Axel R** (1991) *A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition*, Cell, 65 (1), 175-187.
- Burova TV**, Choiset Y, Jankowski CK & Haertlé T (1999) *Conformational stability and binding properties of porcine odorant binding protein*, Biochemistry, 38 (45), 15043-15051.
- Burova TV**, Rabesona H, Choiset Y, Jankowski CK, Sawyer L & Haertlé T (2000) *Why has porcine VEG protein unusually high stability and suppressed binding ability?*, Biochim Biophys Acta., 1478 (2), 267-279.
- Butenandt A**, Beckmann R & Hecker E (1961) [*On the sex attractant of silk-moths. I. The biological test and the isolation of the pure sex-attractant bombykol*], Z Physiol Chem, 30 (324), 71-83.

C

- Caggiano M**, Kauer JS & Hunter DD (1994) *Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus*, Neuron, 13 (2), 339-352.
- Cavaggioni A**, Sorbi RT, Keen JN, Pappin DJ & Findlay JB (1987) *Homology between the pyrazine-binding protein from nasal mucosa and major urinary proteins*, FEBS Lett, 212 (2), 225-228.
- Cavaggioni A & Mucignat-Caretta C** (2000) *Major urinary proteins, alpha (2U)-globulins and aphrodisin*, Biochim Biophys Acta, 1482 (1-2), 218-228.

D

- Dal Monte M**, Andreini I, Revoltella R & Pelosi P (1991) *Purification and characterization of two odorant-binding proteins from nasal tissue of rabbit and pig*, Comp Biochem Physiol B, 99 (2), 445-451.
- Dehnhard M**, Claus R, Pfeiffer S & Schopper D (1991) *Variation in estrus-related odors in the cows and its dependency on the ovary*, Theriogenology, 35 (3), 645-52.
- Dehnhard M & Claus R** (1996) *Attempts to purify and characterize the estrus-signalling pheromone from cow urine*, Theriogenology, 46, 13-22.
- Dehnhard M & Claus R** (1988) *Reliability criteria of bioassay using rats trained to detect estrus-specific odor in cow urine*, Theriogenology, 30 (6), 1127-1138.
- D'Innocenzo B**, Salzano AM, D'Ambrosio C, Gazzano A, Niccolini A, Sorce C, Dani FR, Scalonì A & Pelosi P (2006) *Secretory proteins as potential semiochemical carriers in the horse*, Biochemistry, 45 (45), 13418-13428.

Dulac C & Torello AT (2003) *Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour*, Nat Rev Neurosci, 4 (7), 551-562.

F

Finlayson JS, Hudson DM & Armstrong BL (1969) *Location of the MUP-a locus on mouse linkage group 8*, Genet Res, 14 (3), 329-331.

Flower DR (1996) *The lipocalin protein family: structure and function*, Biochem J, 318, 1-14.

Flower DR (2000) *Experimentally determined lipocalin structures*, Biochim Biophys Acta, 1482 (1-2), 46-56.

Flower DR (2000) *Beyond the superfamily: the lipocalin receptors*, Biochim Biophys Acta, 1482 (1-2), 327-336.

Flower DR, North AC & Sansom CE (2000) *The lipocalin protein family: structural and sequence overview*, Biochim Biophys Acta, 1482 (1-2), 9-24.

G

Golebiowski J, Antonczak S, Fiorucci S & Cabrol-Bass D (2007) *Mechanistic events underlying odorant binding protein chemoreception*, Proteins, 67, 448-458.

Goodman AB (2006) *Retinoid receptors, transporters, and metabolizers as therapeutic targets in late onset alzheimer disease*, J Cell Physiol, 209 (3), 598-603.

Goodwin TE, Eggert MS, House SJ, Weddell ME, Schulte BA & Rasmussen LE (2006) *Insect pheromones and precursors in female African elephant urine*, J Chem Ecol, 32 (8), 1849-1853.

Guiraudie G, Pageat P, Cain AH, Madec I & Nagnan-Le Meillour P (2003) *Functional characterization of olfactory binding proteins for appeasing compounds and molecular cloning in the vomeronasal organ of pre-pubertal pigs*, Chem Senses, 28 (7), 609-619.

Guiraudie G (2003) *Caractérisation de protéines liant des composés à effet apaisant chez le porc*, Thèse de doctorat, Université de Tours, France.

Guiraudie-Capraz G, Slomianny MC, Pageat P, Malosse C, Cain AH, Orgeur P, Nagnan-Le Meillour P (2005a) *Biochemical and chemical supports for a transnatal olfactory continuity through sow maternal fluids*, Chem Senses, 30 (3), 241-251.

Guiraudie-Capraz G, Clot-Faybesse O, Pageat P, Malosse C, Cain AH, Ronin C & Nagnan-Le Meillour P (2005b) *Heterologous expression of piglet odorant-binding protein in Pichia pastoris: a comparative structural and functional characterization with native forms*, J Biotechnol, 117 (1), 11-19.

Greenwood DR, Comeskey D, Hunt MB & Rasmussen LE (2005) *Chemical communication: chirality in elephant pheromones*, Nature, 438 (7071), 1097-8.

Grolli S, Merli E, Conti V, Scaltriti E & Ramoni R (2006) *Odorant binding protein has the biochemical properties of a scavenger for 4-hydroxy-2-nonenal in mammalian nasal mucosa*, FEBS J, 273 (22), 5131-5142.

H

- Hart** GH, Mead SW & Regan WM (1946) *Stimulating the sex drive of bovine males in artificial insemination*, *Endocrinology*, 39, 221-223
- Henzel** WJ, Rodriguez H, Singer AG, Stults JT, Macrides F, Agosta WC & Niall H (1988) *The primary structure of aphrodisin*, *J Biol Chem*, 263 (32), 16682-16687.
- Hou** Y, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Tlili C, Zhang A, Pernellet JC, Briand L, Gomila G, Errachid A, Samitier J, Salvagnac L, Torbiéro B & Temple-Boyer P (2005) *Study of Langmuir and Langmuir-Blodgett films of odorant-binding protein/amphiphile for odorant biosensors*, *Langmuir*, 21 (9), 4058-4065.
- Hudson** R & Distel H (1986) *Pheromonal release of suckling in rabbits does not depend on the vomeronasal organ*, *Physiol Behav*, 37 (1), 123-128.
- Hurst** JL, Payne CE, Nevison CM, Marie AD, Humphries RE, Robertson DH, Cavaggioni A & Beynon RJ (2001) *Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins*, *Nature*, 414 (6864), 631-634.
- Hurst** JL, Robertson DHL, Tolladay U & Beynon RJ (1998) *Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals*, *Anim Behav*, 55 (5), 1289-1297.

I

- Ikematsu** M, Takaoka D & Yasuda M (2005) *Odorant binding initially occurring at the central pocket in bovine odorant-binding protein*, *Biochem Biophys Research Commun*, 333 (4), 1227-1233.

J

- Jacquin-Joly** E, Vogt RG, François MC & Nagnan-Le Meillour P (2001) *Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae**, *Chem Senses*, 26 (7), 833-844.
- Jemiolo** B & Novotny M (1994) *Inhibition of sexual maturation in juvenile female and male mice by a chemosignal of female origin*, *Physiol Behav*, 55 (3), 519-522.

K

- Kajiya** K, Inaki K, Tanaka M, Haga T, Kataoka H & Touhara K.J (2001) *Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants*, *Neurosci*, 21 (16), 6018-6025.
- Kannan** S & Archunan G (2001) *Chemistry of clitoral gland secretions of the laboratory rat: assessment of behavioural response to identified compounds*, *J Biosci*, 26 (2), 247-252.

- Karlson P** & Lüscher M (1959) « *Pheromones* » : a New Term for a Class of Biologically Active Substances, *Nature*, 183, 55-56.
- Keverne EB** (1999) *The vomeronasal organ*, *Science*, 286 (5440), 716-720.
- Kiddy CA**, Mitchell DS & Hawk HW (1984) *Estrus-related odors in body fluids of dairy cows*, *J. Dairy sci*, 67, 388-391
- Klemm WR**, Hawkins GN & De Los santos E (1987) *Identification of compounds in bovine cervico-vaginal mucus extracts that evoke male sexual behaviour*, *Chem Senses*, 12, 77-87.
- Ko HJ** & Park TH (2005) *Piezoelectric olfactory biosensor: ligand specificity and dose-dependence of an olfactory receptor expressed in a heterologous cell system*, *Biosens Bioelectron*, 20 (7), 1327-1332.
- Ko HJ** & Park TH (2008) *Enhancement of odorant detection sensitivity by the expression of odorant-binding protein*, *Biosens Bioelectron*, 23 (7), 1017-1023.
- Korchi A**, Farine JP & Brossut R (1998) *Characterization of two male-specific polypeptides in the tergal glands secretions of the cockroach eucophaea maderae (Dictyoptera, Blaberidae)*, *Insect Biochem Mol Biol*, 28 (2), 113-120.
- Koyama S** (2004) *Primer effects by conspecific odors in house mice: a new perspective in the study of primer effects on reproductive activities*, *Horm Behav*, 46 (3), 303-310.
- Krieger J**, Schmitt A, Löbel D, Gudermann T, Schultz G, Breer H & Boekhoff I (1999) *Selective activation of G protein subtypes in the vomeronasal organ upon stimulation with urine-derived compounds*, *J Biol Chem*, 274 (8), 4655-4662.
- Kumar KR**, Archunan G, Jeyaraman R & Narasimhan S (2000) *Chemical characterization of bovine urine with special reference to oestrus*, *Vet Res Commun*, 24 (7), 445-454.

L

- Lascombe MB**, Bakan B, Buhot N, Marion D, Blein JP, Larue V, Lamb C & Prangé T (2008) *The structure of "defective in induced resistance" protein of Arabidopsis thaliana, DIR1, reveals a new type of lipid transfer protein*, *Protein Sci*, 17 (9), 1522-1530.
- Lazar J**, Greenwood DR, Rasmussen LE & Prestwich GD (2002) *Molecular and functional characterization of an odorant binding protein of the Asian elephant, Elephas maximus: implications for the role of lipocalins in mammalian olfaction*, *Biochemistry*, 41 (39), 1786-1794.
- Lazar J**, Rasmussen LE, Greenwood DR, Bang IS & Prestwich GD (2004) *Elephant albumin: a multipurpose pheromone shuttle*, *Chem Biol*, 11 (8), 1093-1100.
- Leal WS** (2004) *Pheromone unwrapping by pH flip-flopping*, *Chem Biol*, 11 (8), 1029-1031.
- Le Danvic C**, Guiraudie-Capraz G, Abderrahmani D, Zanetta JP & Nagnan-Le Meillour P (2009) *Natural Ligands of Porcine Olfactory Binding Proteins*, *J Chem Ecol*, 35 (7), 741-751.
- Lévy F**, Keller M & Poindron P (2004) *Olfactory regulation of maternal behavior in mammals*, *Horm Behav*, 46 (3), 284-302.

- Liberles** SD & **Buck** LB (2006) *A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium*, *Nature*, 442 (7103), 645-650.
- Loebel** D, **Scaloni** A, **Paolini** S, **Fini** C, **Ferrara** L, **Breer** H & **Pelosi** P (2000) Cloning, post-translational modifications, heterologous expression and ligand-binding of boar salivary lipocalin, *Biochem J*, 350 (2), 369-379.
- Löbel** D, **Jacob** M, **Völkner** M & **Breer** H (2002) *Odorants of different chemical classes interact with distinct odorant binding protein subtypes*, *Chem Senses*, 27 (1), 39-44.
- Löbel** D, **Strotmann** J, **Jacob** M & **Breer** H (2001) *Identification of a third rat odorant-binding protein (OBP3)*, *Chem Senses*, 26 (6), 673-680.
- Löbel** D, **Marchese** S, **Krieger** J, **Pelosi** P & **Breer** H (1998) *Subtypes of odorant-binding proteins heterologous expression and ligand binding*, *Eur J Biochem*, 254 (2), 318-324.

M

- Ma** W & **Klemm** WR (1997) *Variations of equine urinary volatile compounds during the oestrous cycle*, *Vet Res Commun*, 21 (6), 437-446.
- Ma** W, **Miao** Z & **Novotny** MV (1998) *Role of the adrenal gland and adrenal-mediated chemosignals in suppression of estrus in the house mouse: the lee-boot effect revisited*, *Biol Reprod*, 59 (6), 1317-1320.
- Mandiyan** VS, **Coats** JK & **Shah** NM (2005) *Deficits in sexual and aggressive behaviors in Cnga2 mutant mice*, *Nat Neurosci*, 8 (12), 1660-1662.
- Mäntyjärvi** R, **Rautiainen** J & **Virtanen** T (2000) *Lipocalins as allergens*, *Biochim Biophys Acta*, 1482 (1-2), 308-317.
- Marchese** S, **Pes** D, **Scaloni** A, **Carbone** V & **Pelosi** P (1998) *Lipocalins of boar salivary glands binding odours and pheromones*, *Eur J Biochem*, 252 (3), 563-568.
- Marichatou** H, **Tamboura** H & **Traoré** A (2004) *Synchronisation des chaleurs et insémination artificielle bovine*, Fiche technique n°9 INERA-CIDRES.
- Matarazzo** V, **Zsürger** N, **Guillemot** JC, **Clot-Faybesse** O, **Botto** JM, **Dal Farra** C, **Crowe** M, **Demaille** J, **Vincent** JP, **Mazella** J & **Ronin** C (2002) *Porcine odorant-binding protein selectively binds to a human olfactory receptor*, *Chem Senses*, 27 (8), 691-701.
- Mazzini** A, **Maia** A, **Parisi** M, **Sorbi** RT, **Ramoni** R, **Grolli** S & **Favilla** R (2002) *Reversible unfolding of bovine odorant binding protein induced by guanidinium hydrochloride at neutral pH*, *Biochim Biophys Acta*, 1599 (1-2), 90-101.
- Mazzini** A, **Polverini** E, **Parisi** M, **Sorbi** RT & **Favilla** R (2007) *Dissociation and unfolding of bovine odorant binding protein at acidic pH*, *J Struct Biol*, 159 (1), 82-91.
- Mc Glone** JJ & **Morrow** JL (1988) *Reduction of pig agonistic behavior by androstenone*, *J Anim Sci*, 66, 880-884.
- Millery** J, **Briand** L, **Bézirard** V, **Blon** F, **Fenech** C, **Richard-Parpaillon** L, **Quenedey** B, **Pernollet** JC & **Gascuel** J (2005) *Specific expression of olfactory binding protein in the aerial olfactory cavity of adult and developing Xenopus*, *Eur J Neurosci*, 22 (6), 1389-1399.

- Mitchell GB, Clark ME & Caswell JL (2007)** *Alterations in the bovine bronchoalveolar lavage proteome induced by dexamethasone*, *Vet Immunol Immunopathol*, 118 (3-4), 283-293.
- Mitchell GB, Clark ME, Siwicky M & Caswell JL (2008)** *Stress alters the cellular and proteomic compartments of bovine bronchoalveolar lavage fluid*, *Vet Immunol Immunopathol*, 125 (1-2), 111-125.
- Mucignat-Caretta C & Caretta A (1999)** *A Urinary chemical cues affect light avoidance behaviour in male laboratory mice, Mus musculus*, *Anim Behav*, 57 (4), 765-769.
- Mucignat-Caretta C, Caretta A & Cavaggoni A (1995)** *Acceleration of puberty onset in female mice by male urinary proteins*, *J Physiol*, 15 (486), 517-522.

N

- Nagnan-Le Meillour P, Lagant P, Cornard JP, Brimau F, Le Danvic C, Vergoten G & Michalski JC (2009a)** *Phenylalanine 35 and tyrosine 82 are involved in the uptake and release of ligand by porcine odorant-binding protein*, *Biochim Biophys Acta*, 1794 (8), 1142-1150.
- Nagnan-Le Meillour P, Le Danvic C, Brimau F, Chemineau P & Michalski JC (2009b)** *Phosphorylation of Native Porcine Olfactory Binding Proteins*, *J Chem Ecol*, 35 (7) 752-760.
- Nespoulous C, Briand L, Delage MM, Tran V & Pernellet JC (2004)** *Odorant binding and conformational changes of a rat odorant-binding protein*, *Chem Senses*, 29 (3), 189-198.
- Novotny MV, Ma W, Wiesler D & Zidek L (1999)** *Positive identification of the puberty-accelerating pheromone of the house mouse: the volatile ligands associating with the major urinary protein*, *Proc Biol Sci*, 266 (1432), 2017-2022.

P

- Paolini S, Tanfani F, Fini C, Bertoli E & Paolo Pelosi (1999)** *Porcine odorant-binding protein: structural stability and ligand affinities measured by fourier-transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy*, *Biochim Biophys Acta*, 1431 (1), 179-188.
- Paolini S, Scaloni A, Amoresano A, Marchese S, Napolitano E & Pelosi P (1998)** *Amino acid sequence, post-translational modifications, binding and labelling of porcine odorant-binding protein*, *Chem Senses*, 23 (6), 689-698.
- Pelosi P (2001)** *The role of perireceptor events in vertebrate olfaction*, *Cell Mol Life Science*, 58, 503-509.
- Pevsner J, Sklar PB & Snyder SH (1986)** *Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (13), 4942-4946.
- Pevsner J, Hou V, Snowman AM, Snyder SH (1990)** *Odorant-binding protein - Characterization of ligand binding*, *J Biol Chem*, 265 (11), 6118-6125.
- Parisi M, Mazzini A, Sorbi RT, Ramoni R, Grolli S & Favilla R (2003)** *Unfolding and refolding of porcine odorant binding protein in guanidinium hydrochloride: equilibrium studies at neutral pH*, *Biochim Biophys Acta*, 1652 (2), 115-125.

Pelosi P, Baldaccini NE & Pisanelli AM (1982) *Identification of a specific olfactory receptor for 2-isobutyl-3-methoxypyrazine*, *Biochem. J.*, 201, 245-248.

Pelosi P (1998) *Odorant-binding proteins: structural aspects*, *Ann N Y Acad Sci*, 855, 281-293.

R

Rajanarayanan S & Archunan G (2004) *Occurrence of flehmen in male buffaloes (*Bubalus bubalis*) with special reference to estrus*, *Theriogenology*, 61 (5), 861-866.

Rajanarayanan S (2004) *Assessment of flehmen behaviour and identification of urinary pheromones in Buffalo (*Bubalus bubalis*) with special reference to estrus*, Thèse de doctorat, Department of Animal Science, Bharathidasan University, Tamilnadu, India.

Rameshkumar K, Achiraman S, Karthikeyan K & Archunan G (2008) *Ability of mice to detect estrous odor in bovine urine: roles of hormones and behavior in odor discrimination*, *Zoolog Sci*, 25 (4), 349-354.

Rampin O, Jérôme N, Briant C, Boué F, Maurin Y (2006) *Are oestrus odours species specific?*, *Behav Brain Res*, 172 (1), 169-172.

Ramoni R, Vincent F, Grolli S, Conti V, Malosse C, Boyer FD, Nagnan-Le Meillour P, Spinelli S, Cambillau C & Tegoni M (2001) *The insect attractant 1-octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant-binding protein*, *J Biol Chem*, 276 (10), 7150-7155.

Ramoni R, Spinelli S, Grolli S, Conti V, Merli E, Cambillau C & Tegoni M (2008) *Deswapping bovine odorant binding protein*, *Biochim Biophys Acta*, 1784 (4), 651-657.

Ramoni R, Vincent F, Ashcroft AE, Accornero P, Grolli S, Valencia C, Tegoni M & Cambillau C (2002) *Control of domain swapping in bovine odorant-binding protein*, *Biochem J*, 365 (3), 739-748.

Ramoni R, Vincent F, Grolli S, Conti V, Malosse C, Boyer FD, Nagnan-Le Meillour P, Spinelli S, Cambillau C & Tegoni M (2001) *The insect attractant 1-octen-3-ol is the natural ligand of bovine odorant-binding protein*, *J Biol Chem*, 276 (10), 150-155.

Rasmussen LE & Greenwood DR (2003) *Frontalin: a chemical message of musth in Asian elephants (*Elephas maximus*)*, *Chem Senses*, 28 (5), 433-446.

Rasmussen LE (2001) *Source and cyclic release pattern of (Z)-7-dodecenyl acetate, the pre-ovulatory pheromone of the female Asian elephant*, *Chem Senses*, 26 (6), 611-623. Erratum in: *Chem Senses*, 26(7), 935.

Rasmussen LE, Lee TD, Zhang A, Roelofs WL & Daves GD Jr (1997) *Purification, identification, concentration and bioactivity of (Z)-7-dodecen-1-yl acetate: sex pheromone of the female Asian elephant, *Elephas maximus**, *Chem Senses*, 22 (4), 417-437.

Rasmussen LE, Schmidt MJ, Henneous R, Groves D & Daves GD Jr (1982) *Asian bull elephants: Flehmen-like responses to extractable components in female elephant estrous urine*, *Science*, 217 (4555), 159-162.

Reed HCB, Melrose DR & Patterson LS (1974) *Androgen steroids as an aid to the detection of oestrus in pig artificial insemination*, *Br Vet J*, 130, 61-67.

Rekwot PI, Ogwu D, Oyedipe EO & Sekoni VO (2001) *The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction*, *Anim Reprod Sci*, 65 (3-4), 157-170.

Rivard G & Klemm (1989) *Two body fluids containing bovine estrous pheromone(s)*, Chem Senses, 14 (2), 273-279.

Robertson DH, Cox KA, Gaskell SJ, Evershed RP & Beynon RJ (1996) *Molecular heterogeneity in the Major Urinary Proteins of the house mouse Mus musculus*, Biochem J, 316 (1), 265-272.

S

Sam M, Vora S, Malnic B, Ma W, Novotny MV & Buck LB (2001) *Neuropharmacology. Odorants may arouse instinctive behaviours*, Nature, 412 (6843), 142-146.

Sankar R & Archunan G (2004) *Flehmen response in bull: role of vaginal mucus and other body fluids of bovine with special reference to estrus*, Behav Processes, 67 (1), 81-86.

Sankar R & Archunan G (2008) *Identification of putative pheromones in bovine (Bos taurus) faeces in relation to estrus detection*, Anim Reprod Sci, 103 (1-2), 149-153.

Scaloni A, Paolini S, Brandazza A, Fantacci M, Bottiglieri C, Marchese S, Navarrini A, Fini C, Ferrara L & Pelosi P (2001) *Purification, cloning and characterisation of odorant- and pheromone-binding proteins from pig nasal epithelium*, Cell Mol Life Sci, 58 (5-6), 823-834.

Schaal B, Coureaud G, Langlois D, Giniès C, Sémon E & Perrier G (2003) *Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary phéromone*, Nature, 424 (6944), 68-72.

Schwende FJ, Wiesler D, Jorgenson JW, Carmak M & Novotny M (1986) *Urinary volatile constituents of the mouse, Mus musculus, and their endocrine dependency*, J Chem Ecol, 12, 277-295.

Selvaraj R & Archunan G (2002) *Role of male scent glands in improving poison bait acceptance in female rats, Rattus norvegicus*, Indian J Exp Biol, 40 (1), 53-57.

Sharrow SD, Vaughn JL, Zidek L, Novotny MV & Stone MJ (2004) *Pheromone binding by polymorphic mouse major urinary proteins*, Protein Sci, 11 (9), 2247-2256. Erratum in: Protein Sci. 2004 13 (1):306.

Singer AG, Agosta WC, Clancy AN & Macrides F (1987) *The chemistry of vomeronasally detected pheromones: characterization of an aphrodisiac protein*, Ann N Y Acad Sci, 519, 287-298.

Singer AG & Macrides F (1990) *Aphrodisin : pheromon eor transducer?*, Chem Senses, 15, 199-203.

Singer AG, Macrides F, Clancy AN & Agosta WC (1986) *Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge*, J Biol Chem, 261 (28), 13323-13326.

Slawson C & Hart GW (2003) *Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation*, Curr Opin Struct Biol, 13 (5), 631-636.

Soini HA, Wiesler D, Koyama S, Féron C, Baudoin C & Novotny MV (2009) *Comparison of urinary scents of two related mouse species, Mus spicilegus and Mus domesticus*, J Chem Ecol, 35 (5), 580-589.

Spinelli S, Vincent F, Pelosi P, Tegoni M & Cambillau C (2002) *Boar salivary lipocalin. Three-dimensional X-ray structure and androsterol/androstenone docking simulations*, Eur J Biochem, 269 (10), 2449-2456.

Sung JH, Ko HJ & Park TH (2006) *Piezoelectric biosensor using olfactory receptor protein expressed in Escherichia coli*, Biosens Bioelectron, 21 (10), 1981-1986.

T

Takami S (2002) *Recent progress in the neurobiology of the vomeronasal organ*, Microsc Res Tech, 58 (3), 228-250.

Tcatchoff L (2007) *Etude des interactions entre une protéine humaine de liaison aux odorants et ses partenaires, odorants et récepteurs olfactifs*, Thèse de l'Université de Versailles-Saint-Quentin, 153 p.

Tcatchoff L, Nespoulous C, Pernollet JC & Briand L (2006) *A single lysyl residue defines the binding specificity of a human odorant-binding protein for aldehydes*, FEBS Lett, 580, 2102-2108.

Tegoni M, Pelosi P, Vincent F, Spinelli S, Campanacci V, Grolli S, Ramoni R & Cambillau C (2000) *Mammalian odorant binding proteins*, Biochim Biophys Acta, 1482 (1-2), 229-240.

Tegoni M, Ramoni R, Bignetti E, Spinelli S & Cambillau C (1996) *Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer*, Nat Struct Biol, 3, 863-867.

Tirindelli R, Keen JN, Cavaggioni A, Eliopoulos EE, Findlay JB (1989) *Complete amino acid sequence of pyrazine-binding protein from cow nasal mucosa*, Eur J Biochem, 185 (3), 569-572.

V

Vandenbergh JG (1969) *Male odor accelerates female sexual maturation in mice*, Endocrinology, 84 (3), 658-660. No abstract available.

Vidic J, Grosclaude J, Monnerie R, Persuy MA, Badonnel K, Baly C, Caillol M, Briand L, Salesse R & Pajot-Augy E (2008) *On a chip demonstration of a functional role for Odorant Binding Protein in the preservation of olfactory receptor activity at high odorant concentration*, Lab Chip, 8 (5), 678-688.

Vincent F, Ramoni R, Spinelli S, Grolli S, Tegoni M & Cambillau C (2004) *Crystal structures of bovine odorant-binding protein in complex with odorant molecules*, Eur J Biochem, 271 (19), 3832-3842.

Vincent F, Spinelli S, Ramoni R, Grolli S, Pelosi P, Cambillau C & Tegoni M (2000) *Complexes of porcine odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes*, J Mol Biol, 300 (1), 127-139.

Z

Zhang X & Firestein S (2002) *The olfactory receptor gene superfamily of the mouse*, Nat Neurosci, 5 (2), 124-133.

Liste de Figures

Figure I-7 - Classifications des médiateurs chimiques.

Figure I-8 - Coupe sagittale de tête de Porc.

Figure I-9 - Schéma localisant le VNO.

Figure I-10 - Organisation de l'épithélium olfactif (souris).

Figure I-11 - Schéma d'un récepteur olfactif.

Figure I-12 - Cascades d'événements impliqués dans la transduction du signal olfactif.

Figure A-1 - Flehmen observé chez le buffle (*Bubalus bubalis*).

Figure A-2 - Composés spécifiques de l'oestrus identifiés chez les mammifères.

Figure A-3 - Implication des protéines de liaison dans la détection de la phéromone sexuelle de l'éléphant.

Figure A-4 - Le cycle oestral de la vache.

Figure A-5 - Profils chromatographiques comparés des urines de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction par SPME.

Figure A-6 - Composés variant au cours du cycle dans les urines de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction par SPME.

Figure A-7 - Profils chromatographiques comparés des urines de la vache 150 au stade folliculaire pré-ovulatoire après extraction par SPME à la suite du traitement trypsique.

Figure A-8 - Composés identifiés dans les urines de la collecte « Nouzilly 2 ».

Figure A-9 - Profils chromatographiques comparés des urines de vache collecte « Nouzilly 2 » après extraction au DCM.

Figure A-10 - Composés identifiés dans les urines de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction au DCM.

Figure A-11 - Profils chromatographiques comparés des mucus vaginaux de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction par SPME.

Figure A-12 - Profils chromatographiques comparés des mucus vaginaux de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction au DCM.

Figure A-13 - Composés identifiés comme spécifiques de stade dans les urines des vaches superovulées de la collecte « Châteauvillain 1 ».

Figure A-14 - Profils chromatographiques comparés des urines des vaches 4248 et 9351 de la collecte « Châteauvillain 1 » au cours des chaleurs.

Figure A-15 - Composés non identifiés spécifiques du stade pré-oestrus dans les urines de la vache 4248.

Figure A-16 - Composés identifiés dans les urines de buflesse en oestrus.

Figure A-17 - Le 4-méthyl phénol et l'acide 9-octadécénoïque dans les urines des vaches de la collecte « Châteaouvillain 1 ».

Figure A-18 - Profils chromatographiques comparés des urines des vaches 0630, 0832 et 5260 de la collecte de Chateaouvillain 2.

Figure A-20 - Profils chromatographiques comparés des urines des vaches 0631 de la collecte de Chateaouvillain 2.

Figure A-21 - Profils chromatographiques comparés des urines de la vache 4248 - détail de la 22^{ème} à 32^{ème} min.

Figure A-22 - Profils chromatographiques comparés des mucus vaginaux sur les trois collectes réalisée à Châteaouvillain.

Figure A-23 - Détail d'un chromatogramme présentant les hydrocarbures et acides gras présents dans les mucus vaginaux des vaches collectées à la station expérimentale de Châteaouvillain.

Figure A-24 - Profils chromatographiques comparés des mucus vaginaux de la vache 5644 au cours de l'oestrus lors de la collecte « Châteaouvillain 1 ».

Figure A-26 - Composés spécifiques du mucus vaginal de la vache 5260 lors de la collecte « Châteaouvillain 3 ».

Figure A-27 - Profils chromatographiques comparés des urines de génisses au cours d'un cycle - Exemple de la génisse 1920.

Figure A-28 - Composés identifiés de façon spécifique de l'oestrus chez les génisses collectées.

Figure A-29 - Profils chromatographiques comparés des urines de génisses au cours d'un cycle - Exemple de la génisse 1920.

Figure A-30 - Composés identifiés de façon spécifique de l'oestrus chez les génisses collectées.

Figure B-1 - Représentaion de la structure secondaire du dimère de l'OBPb avec un ligands avec un ligand dans chaque cavité.

Figure B-2 - Electrophorèse en conditions dénaturantes des échantillons protéiques de mucus nasal (MN), de muqueuse respiratoire (MR) et d'organe voméronasal (VNO) extraits à partir de tissus femelle et mâle.

Figure B-3 - Cartographie peptidique de l'OBPb.

Figure B-4 - Séquences peptidiques de l'OBPb disponibles dans GenBank.

Figure B-5 - Electrophorèse en conditions natives (PAGE) des échantillons protéiques de mucus nasal (MN), de muqueuse respiratoire (MR) et d'organe voméronasal (VNO) extraits à partir de tissus femelle et mâle.

Figure B-6 - Purification des protéines extraites des MR mâles et femelles par HPLC échangeuse d'anions (colonne ProPac PA1).

Figure B-7 - Purification des protéines extraites des MN mâles et femelles par HPLC échangeuse d'anions (colonne ProPac PA1).

Figure B-8 - Test des du sérum anti-OBPb produit chez le lapin à partir de l'OBPb majoritaire purifiée à partir de la muqueuse respiratoire mâle.

Figure B-9 - Immunodétection de l'OBPb dans les tissus olfactifs (MR et VNO) et dans les mucus nasaux mâle et femelle.

Figure B-10 - Séquence nucléotidique de l'OBPb avec une localisation des amorces utilisées pour l'amplification des transcrits de l'OBPb dans les tissus.

Figure B-11 - Fragments d'ADNc amplifiés par RT-PCR avec les oligonucléotides spécifiques de l'OBPb.

Figure B-12 - Séquence peptidique de l'OBPb figurant les modifications post-traductionnelles prédites.

Figure B-13 - Immunodétection des phosphorylations de l'OBPb par Western-Blot réalisé avec les trois anticorps, anti-phosphosérine, anti-phosphothréonine et anti-phosphotyrosine.

Figure B-14 - Localisation des acides aminés phosphorylés sur la séquence de l'OBPb (XP_001253219.1) après BEMAD.

Figure B-15 - Immunodétection des chaînes glycaniques.

Figure B-16 - Immunodétection des chaînes glycaniques après traitement à la PNGase F.

Figure B-17 - Immunodétection des chaînes glycaniques sur un nouveau lot d'échantillon protéique.

Figure B-18 - Mise en évidence de la présence d'une O-GlcNac sur l'OBPb minoritaire des MN femelle.

Figure B-19 - Comparaison des profils protéiques urinaires au cours du cycle oestral de la truie.

Figure B-20 - Comparaison des profils protéiques urinaires au cours du cycle oestral de la vache.

Figure B-21 - Immunodétection de l'OBPb dans les foies mâle et femelle et dans les mucus vaginaux par Western-blot après séparation en conditions.

Figure B-22 - Analyse par GC/MS des ligands extraits de l'albumine urinaire bovine et de l'OBPb du mucus nasal.

Figure C-1 - Séquences nucléotidique (Numéro d'accèsion GenBank NM_213796.1) et protéique de l'OBP porcine.

Figure C-2 - Purification du variant adulte de l'OBP porcine recombinante.

Figure C-3 - Caractérisation des isoformes d'OBPa recombinante.

Figure C-4 - Mise en évidence des phosphorylations de l'OBPa.

Figure C-5 - Alignement des séquences peptidiques de l'OBP bovine publiées dans GenBank (numéros d'accèsion XP_001253219.1 et P07435.2) et de celles de l'OBP recombinante sauvage (OBPrec) et de l'OBP recombinante mutée (OBPN9rec).

Figure C-6 - Analyse des clones d'OBPb et d'OBPN9A exprimés par *P.pastoris*.

Figure C-7 - Cinétique de production des OBP bovines recombinantes.

Figure C-8 - Purification de l'OBPb sauvage recombinante.

Figure C-9 - Purification de l'OBPN9A recombinante.

Figure C-10 - Immobilisation des variants biotinylés de l'OBP (300 µg/ml) sur sensor chip SA.

Figure C-11 - Immobilisation de l'OBPj sur le sensor chip AU.

Figure C-12 - Structure chimique des ligands utilisés pour les tests d'interaction des OBP porcines recombinantes fixées sur sensor chip SA et sur sensor chip AU.

Figure C-13 - Etude par RPS de l'interaction des trois variants de l'OBPp recombinants fixés sur sensor chip SA avec les ligands.

Figure C-14 - Etude par RPS des interactions entre l'OBPj recombinante fixée sur sensor chip AU (200 µg/ml) et les ligands odorants.

Figure C-15 - Spectres d'émission du tampon Tris/HCl, de l'AMA et de l'OBPb native majoritaire seule, en présence de 0,8 et 2 µM d'AMA aux longueurs d'onde d'excitation 295 nm et 380 nm.

Figure C-16 - Fixation de l'AMA sur les OBP bovines natives et recombinantes (sauvage et mutée).

Figure C-17 - Courbe de titration de l'AMA pour l'OBP bovine native majoritaire résultant de la mesure de l'intensité de fluorescence de l'AMA (480 nm) en fonction de sa concentration pour une excitation à 295 nm.

Figure C-18 - Déplacement de l'AMA par l'1-octénol et le 4-méthyl phénol.

Figure C-19 - Courbe de compétition entre l'1-octénol et l'AMA lié à la protéine.

Figure M-1 - Schéma de la technique SPME.

Figure M-2 - Gradient d'élution utilisé en chromatographie échangeuse d'ions pour la purification des protéines.

Figure M-3 - Schéma réactionnel du BEMAD (β-élimination suivie d'une addition de Michael) effectué sur un résidu sérine.

Figure M-4 - Carte de restriction du vecteur *pCR[®] 2.1-TOPO[®]*

Figure M-5 - Schéma de la 5'RACE effectuée à l'aide du kit « FirstChoice[®] RLM-RACE » (Ambion).

Figure M-6 - Carte de restriction du vecteur *pPIC3.5K*.

Figure M-7 - Recombinaison et intégration du plasmide dans le génome de *P.pastoris* par double recombinaison homologue.

Figure M-8 - Schéma récapitulatif du principe de mutagenèse dirigée réalisée à l'aide du kit « QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis ».

Figure M-9 - Principe de la résonance plasmonique de surface utilisée par le BIACORE.

Figure M-10 - Sensorgramme.

Figure M-11 - Principe de la mesure d'affinité par déplacement de sonde.

Liste des tableaux

Tableau A-1 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les vaches collectées lors de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction par SPME.

Tableau A-2 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé donné en fonction du stade du cycle après extraction SPME des urines de la collecte « Nouzilly 2 ».

Tableau A-3 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les vaches collectées lors de la collecte « Nouzilly 2 » après extraction par DCM.

Tableau A-4 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé donné en fonction du stade du cycle après extraction au DCM des urines de la collecte « Nouzilly 2 ».

Tableau A-5 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les vaches de la collecte « Châteauvillain 1 » après extraction par DCM.

Tableau A-6 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé en fonction du stade du cycle.

Tableau A-7 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les vaches de la collecte « Châteauvillain 2 » après extraction par DCM.

Tableau A-8 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé en fonction du stade du cycle.

Tableau A-9 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les vaches de la collecte « Châteauvillain 3 » après extraction par DCM.

Tableau A-10 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé en fonction du stade du cycle.

Tableau A-11 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les génisses de la collecte « Nouzilly 3 » après extraction par DCM.

Tableau A-12 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé en fonction du stade du cycle.

Tableau A-13 - Tableau de synthèse des composés variant au cours du cycle chez les génisses de la collecte « Nouzilly 3 » après extraction par DCM.

Tableau A-14 - Tableau de synthèse montrant le nombre de vaches présentant les mêmes variations pour un composé en fonction du stade du cycle.

Tableau B-1 - Tableau répertoriant les masses peptidiques obtenues après digestion trypsique et analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des protéines majoritaires des tissus olfactifs bovins.

Tableau B-2 - Tableau répertoriant les masses peptidiques obtenues après digestion trypsique et analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF des protéines majoritaires des tissus olfactifs bovins séparés par électrophorèse en conditions non dénaturantes.

Tableau B-3 - Récapitulatif des modifications post-traductionnelles prédites après les analyses par bioinformatique.

Tableau B-4 - Localisation des sites de phosphorylation de l'OBPb par la technique du BEMAD.

Tableau B-5 - Tableau répertoriant les différentes lectines utilisées et leurs propriétés de reconnaissance des polysaccharides.

Tableau B-6 - Analyse par MALDI-TOF MS des peptides obtenus après digestion trypsique de la protéine marquée par l'anticorps RL2.

Tableau C-1 - Analyse par MALDI-TOF MS des peptides obtenus après digestion trypsique des OBPb recombinantes réduites et carboxyméthylées.

Tableau C-2 - Analyse par MALDI-TOF MS des peptides obtenus après digestion trypsique des OBPb recombinantes réduites et carboxyméthylées.

Tableau C-3 - Longueurs d'onde des différentes bandes obtenues après décomposition des spectres de fluorescence de l'OBPb et de l'AMA (longueurs d'onde d'excitation λ_{ex} de 295 nm et 380 nm).

Tableau M-1 - Animaux collectés à la station expérimentale de Châteauvillain entre mai 2007 et avril 2008.

Tableau M-2 - Collecte des urines de génisses.

Tableau M-3 - Composition des gels de polyacrylamide utilisés lors de la séparation des protéines.

Tableau M-4 - Nom, séquence et référence des amorces nucléotidiques choisies pour l'amplification et la mutagenèse de l'ADNc codant l'OBP bovine et pour l'insertion dans le vecteur de clonage pPic3.5K.

Tableau M-5 - Composition des milieux utilisés pour l'amplification des plasmides et la croissance des levures GS115.

L'œstrus (ou chaleurs) est une période critique dans la mise en place des processus de reproduction au sein des élevages, notamment dans le cadre d'une reproduction par insémination artificielle. D'une détection précise de l'œstrus dépend un bon rendement de reproduction. Or, les techniques de détection actuelles s'avèrent lourdes à mettre en place, onéreuses et n'assurent pas une détection systématique de l'œstrus. L'objectif de ce travail est de **chercher des méthodes nouvelles** de détection de l'œstrus basées sur les **processus olfactifs de reconnaissance des chaleurs par le mâle**, par l'intermédiaire de signaux chimiques émis dans les urines de femelle. La connaissance de l'identité chimique de ces signaux, ainsi que de leurs protéines de liaison dans les tissus olfactifs devrait permettre le **développement d'un biosenseur** sur lequel seraient greffées les protéines de liaison, permettant de détecter de façon automatique et précise les composés volatils émis par les femelles en œstrus. La mise au point d'un tel biosenseur nécessite une étude approfondie des interactions entre protéine et signal chimique. Afin de mettre en évidence les signaux chimiques de l'œstrus chez les bovins (*Bos Taurus*), des urines de vaches (30) ont été collectées à différents stades de leur cycle œstral. Après extraction par phase organique, la composition chimique de ces urines a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La comparaison des profils chimiques urinaires au cours de cycle œstral a permis l'identification d'une série de composés présents de façon spécifique aux stades pré-œstrus et/ou œstrus chez certains animaux. Une **grande variabilité interindividuelle** et entre les collectes a été observée. Des tests comportementaux sont en cours afin de valider l'activité biologique des composés identifiés et de confirmer leur implication dans la détection de l'œstrus par le mâle. Aucune protéine impliquée dans la liaison des composés œstrus-spécifiques identifiés n'a pu être mise en évidence dans les urines des femelles émettrices. La sérumalbumine, décrite chez l'éléphant comme liant la phéromone sexuelle femelle, a été retrouvée dans les urines. Chez l'animal détecteur, plusieurs isoformes de la **protéine bovine de liaison aux odeurs (OBPb)** ont pu être mises en évidence dans les tissus olfactifs. Des analyses bioinformatiques ont permis de définir des sites potentiels de phosphorylation et de glycosylation sur l'OBPb. Les études biochimiques réalisées ont confirmé la phosphorylation d'un des variants de l'OBPb et la présence d'une chaîne N-glycannique sur la partie N-terminale de la protéine. L'existence d'une diversité d'OBPb suggère une spécificité de liaison de chaque isoforme vis-à-vis des ligands odorants. Leur propriété de liaison a été quantifiée par spectroscopie de fluorescence, ouvrant ainsi la voie à des études de relations structure-fonction de ces OBP.

Abstract

Estrus (or heat) detection is the critical stage in livestock reproduction. Efficiency of artificial insemination, the major method of reproduction used in cattle, depends on the accurate detection of this short female stage. Currently used detection methods are quite expensive and insecure. This work aims to the elucidation of chemical communication involved in estrus detection by the male. Indeed, male can detect heats by **olfactory cues emitted in urine of female**. Identification of such chemical cues and their associated binding proteins in estrus behaviour will permit to develop **new biotechnological tools as biosensors** for estrus detection. To characterize estrus specific molecules, urine from 30 cows was collected at specific stages of the estrus cycle and their chemical composition has been assayed by GC/MS analysis. No systematic estrus specific compounds have been characterized, but we were able to characterize a few compounds as pre-estrus and/or estrus specific in some animals. Identified compounds remain to be tested for their biological activity and ability to elicit sexual behaviour in order to confirm their real implication in estrus detection. No protein binding these molecules could be identified in urine. The **urinary serum albumin**, described in female elephant urine as a pheromone carrier protein, was characterized. The study of protein in the olfactory area led us to identify several isoforms of **bovine Odorant Binding Protein (bOBP)**, in male and female olfactory tissues. Isoforms can be distinguished by their post-translational modifications. Our biochemical experiments showed phosphorylation on one bOBP variant and a N-glycan is present at the N-terminus of the protein. Existence of various bOBP isoforms suggests function specificity, in particular in their binding properties. Spectroscopic fluorescence experiments were performed to analyze the structure-function relationships between the various bOBP isoforms and odorant molecules to ascertain this hypothesis.