

**AFPP – ÉCOLOGIE CHIMIQUE :
NOUVELLES CONTRIBUTIONS À LA PROTECTION DES CULTURES CONTRE LES RAVAGEURS
MONTPELLIER – 24 OCTOBRE 2017**

**LES RÉCEPTEURS OLFACTIFS DES INSECTES : CIBLES POTENTIELLES POUR DES STRATÉGIES
INNOVANTES DE BIOCONTRÔLE**

A. DE FOUCHIER^(1,2), W. WALKER III.⁽³⁾, M. BINYAMEEN.⁽⁴⁾, F. KOUTROUMPA⁽¹⁾, C. MESLIN⁽¹⁾,
G. CABALLERO-VIDAL^(1,2), L. BASTIN-HELINE^(1,2), S. ROBIN⁽⁵⁾, A. BRETAUDEAU⁽⁵⁾, F. LEGEAI⁽⁵⁾,
M. LARSSON⁽³⁾, N. MONTAGNÉ⁽²⁾, E. JACQUIN-JOLY⁽¹⁾

⁽¹⁾INRA, Institute of Ecology & Environmental Sciences of Paris, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France (arthur.de-fouchier@inra.fr, fotini.koutroumpa@inra.fr, camille.meslin@inra.fr, gabriela.caballero@inra.fr, emmanuelle.joly@inra.fr)

⁽²⁾Sorbonne Universités – UPMC Univ Paris 06, Institute of Ecology & Environmental Sciences of Paris, 7 quai Saint Bernard, 75252 Paris Cedex 05, France (lucie.bastin-heline@upmc.fr, nicolas.montagne@upmc.fr)

⁽³⁾Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Sundsvägen 14, 230 53 Alnarp, Sweden (William.B.Walker.III@slu.se, mattias.larsson@slu.se)

⁽⁴⁾Department of Entomology, Faculty of Agricultural Sciences & Technology, Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan (mbinyameen@bzu.edu.pk)

⁽⁵⁾INRA, INRIA, IRISA, Genscale, Campus Beaulieu, Rennes, France (stephanie.robin@inra.fr, anthony.bretauudeau@irisa.fr, fabrice.legeai@irisa.fr)

RÉSUMÉ

Nombre de comportements impliqués dans les ravages causés aux cultures (reproduction, reconnaissance et choix de la plante hôte et des sites de ponte,...) sont étroitement liés aux capacités olfactives des insectes. Les acteurs premiers de l'olfaction sont les récepteurs olfactifs (OR), qui apparaissent comme des cibles pertinentes pour la mise au point de stratégies innovantes de biocontrôle. Par la combinaison d'approches transcriptomiques, génomiques, bioinformatiques et fonctionnelles, nous avons identifié et caractérisé les OR de la noctuelle *Spodoptera littoralis* Boisduval, insecte très polyphage et principal ravageur du coton en Afrique, Asie du Sud-Ouest et tout le bassin méditerranéen. Nos résultats permettent non seulement la mise en évidence d'OR clés à cibler mais aident aussi à comprendre comment un insecte mobilise un répertoire de récepteurs adapté à son écologie.

Mots-clés : Olfaction, récepteur olfactif, biocontrôle, ravageur, *Spodoptera littoralis*.

ABSTRACT

INSECT OLFATORY RECEPTORS: POSSIBLE TARGETS FOR NEW BIOCONTROL STRATEGIES

Olfaction underlies several of insect behaviours that are critical for crop aggression - including reproduction, host selection and oviposition. At the core of the olfactory detection are the olfactory receptors (ORs), which appear as attractive targets for the development of innovative strategies of biocontrol. Combining transcriptomics, genomics, bioinformatics and functional studies, we identified and characterized the OR of the noctuid *Spodoptera littoralis* Boisduval, a polyphagous pest that is the major enemy of cotton in Africa, South-West Asia and all the Mediterranean Basin. Our results not only highlight key ORs as targets but also contribute to understand how an insect species developed an OR repertoire adapted to its ecology.

Keywords: Olfaction, odorant receptor, biocontrol, pest, *Spodoptera littoralis*.

INTRODUCTION

Il est estimé qu'1/6 de la production agricole mondiale est décimée par les insectes ravageurs des cultures et des denrées stockées. Le contrôle des populations de ravageurs est essentiellement assuré par l'utilisation d'insecticides. Cependant, en raison de leur nocivité et des dangers pour l'environnement, des moyens alternatifs sont fortement encouragés.

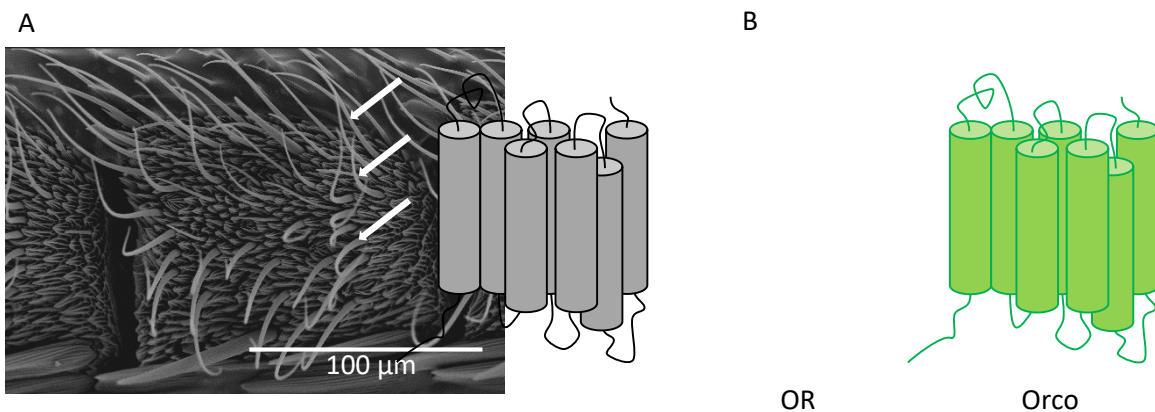
Nombre de comportements impliqués dans les ravages causés aux cultures (reproduction, reconnaissance et choix de la plante hôte et des sites de ponte,...) sont étroitement liés aux capacités olfactives des insectes. Ainsi, des moyens de lutte par perturbation olfactive ont été développés, comme par exemple les pièges à phéromones ou la confusion sexuelle (Witzgall *et al*, 2010). Ces moyens sont cependant limités et, dans un contexte de diminution de l'utilisation des insecticides, le développement d'autres approches est nécessaire. Récemment, la compréhension des mécanismes moléculaires de la communication olfactive des insectes ouvre de nouvelles voies de recherche pour la mise au point de stratégies innovantes de biocontrôle.

Les acteurs clés impliqués dans la reconnaissance des signaux chimiques sont les récepteurs olfactifs (OR). Ces récepteurs sont des protéines exprimées dans les membranes des dendrites des neurones olfactifs. Ces neurones sont eux-mêmes abrités dans des structures morpho-fonctionnelles appelées sensilles olfactives. Ce sont des expansions cuticulaires portées par les organes sensoriels périphériques des insectes, essentiellement les antennes (Figure 1).

Figure 1 : A. Photographie en microscopie électronique à balayage d'un segment antennaire d'un adulte mâle de *Spodoptera littoralis*. Les expansions cuticulaires –les sensilles olfactives- sont bien visibles (flèches) (Photos: M.C. François et C. Monsempes).
B. Schéma d'un récepteur olfactif d'insecte, constitué de deux sous-unités : une unité OR associée à un co-récepteur Orco. Ces deux sous-unités sont des protéines à 7 domaines transmembranaires localisées dans les membranes des dendrites des neurones olfactifs.

A. Scanning electron microscopy picture of an antennal segment from a adult male of *Spodoptera littoralis*. Cuticular expansions – the olfactory sensilla – are visible (arrows) (Pictures : M.C. François and C. Monsempes).

B. Drawing of an insect odorant receptor, that consists of two subunits : an OR plus a co-receptor named Orco. Both OR and Orco are 7 transmembrane proteins expressed in the dendritic membrane of the olfactory sensory neurons.



Chaque espèce exprime entre 40 et 400 OR, qui sont mobilisés de façon combinatoire pour reconnaître toute une palette de molécules odorantes. En général, un neurone olfactif n'exprime qu'un type de récepteur ainsi qu'un co-récepteur appelé Orco, identique pour tous les neurones olfactifs et très conservé entre les espèces. OR et Orco fonctionnent en dimère, l'ensemble formant un canal ionique qui, lors de la liaison avec le ligand, s'ouvre pour laisser passer les ions depuis l'extérieur du neurone vers le milieu intracellulaire. Ainsi, le signal chimique est transformé en signal électrique qui va remonter le long de l'axone jusqu'au système nerveux central. L'intégration, dans le cerveau, des signaux envoyés par les neurones périphériques entrainera le comportement adapté (Maibèche *et al*, 2014).

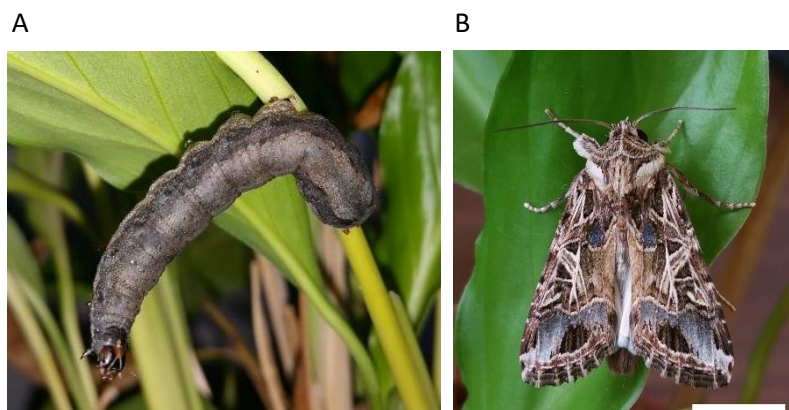
Ces OR apparaissent comme des cibles pertinentes pour la mise au point de méthodes de lutte sélectives: 1) ils sont très différents des OR de vertébrés, ce qui permet d'éviter des effets néfastes pour l'homme ou d'autres mammifères ; 2) ils sont très divergents entre insectes, ce qui permet d'agir de manière sélective et de préserver les insectes bénéfiques ; 3) ils présentent une structure à 7 domaines transmembranaires, semblable à celle des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), pour lesquels la pharmacologie a développé un savoir-faire unique pour le dessin d'agonistes ou d'antagonistes. Une telle approche de « physiologie inverse » permet souvent d'identifier à large échelle des composés nouveaux, plus actifs, plus efficaces que les ligands naturels.

Cependant, un prérequis pour développer ce type d'approche est d'identifier les OR clés à cibler, c'est-à-dire les OR associés à des comportements intéressants à perturber. Or, ces récepteurs, de par leur extrême divergence entre espèces, sont difficiles à identifier si le génome de l'espèce considérée n'est pas séquencé. De plus, leur caractérisation fonctionnelle – c'est-à-dire identifier le ou les odorants qui les activent - est difficile.

Afin d'apporter une preuve de concept pour ce type d'approche moléculaire, nous travaillons sur la noctuelle du coton, *Spodoptera littoralis* Boisduval (Figure 2). Les noctuelles comprennent des bioagresseurs parmi les plus dévastateurs et cette espèce, très polyphage, est le principal ravageur du coton en Afrique, Asie du Sud-Ouest et tout le bassin méditerranéen. Il attaque aussi bon nombre d'autres cultures (Maibèche et Jacquin-Joly 2014), on lui connaît plus de 80 plantes hôtes différentes (Salama *et al*, 1970). Cette espèce est une espèce modèle en écologie chimique : nous disposons de beaucoup de données sur sa physiologie olfactive, sur ses comportements, et sur les signaux olfactifs biologiquement actifs chez *S. littoralis*. Par le séquençage de son transcriptome chimiosensoriel, puis de son génome, nous avons identifié son répertoire d'OR. Puis, par le développement d'outils fonctionnels, nous en avons caractérisé un large éventail.

Figure 2 : Photographies de la noctuelle de coton *Spodoptera littoralis*.
A. Chenille de dernier stade larvaire. B. Adulte. Echelles : 1 cm.
(Photos : E. Jacquin-Joly)

Pictures of the cotton leafworm *Spodoptera littoralis*.
A. Last instar larvae. B. Adult. Bars : 1 cm.
(Pictures from E. Jacquin-Joly)



MATÉRIEL ET MÉTHODE

TRANSCRIPTOMIQUE ET GENOMIQUE

Des antennes d'adultes des deux sexes ainsi que des antennes et palpes de chenilles ont été collectées afin d'en extraire l'ARN. Différentes techniques de séquençage ont été combinées (Sanger, 454, Illumina) et les données obtenues ont été utilisées pour assembler le transcriptome chimiosensoriel de *S. littoralis* par l'outil bioinformatique Trinity. La recherche d'OR potentiels a été effectuée par l'outil BLAST en utilisant comme requête des séquences d'OR disponibles dans les bases de données type GenBank.

Le génome a été séquençé par la combinaison de séquençage Illumina et PacBio et les données assemblées par l'outil Platanus. L'ADN utilisé a été extrait de chenilles mâles frères issus d'une lignée consanguine élevée au laboratoire pour éviter trop de polymorphismes. Les OR potentiels ont été recherchés par BLAST, puis les modèles de gènes ont été affinés par les outils bioinformatiques Scipio et Exonerate, et enfin nettoyés manuellement sur l'outil WebApollo, en s'aidant si besoin du transcriptome obtenu.

ETUDES FONCTIONNELLES DES OR

Parmi les différents systèmes développés pour l'étude fonctionnelle des OR (Montagne *et al*, 2015), nous avons privilégié leur expression fonctionnelle dans les neurones olfactifs de l'insecte modèle *Drosophila melanogaster* Meigen, qui propose un contexte neuronal *in vivo* unique (Gonzalez *et al*, 2016). Par l'utilisation du système Gal4-UAS, nous avons ciblé l'expression des OR de *S. littoralis* (SlitOR) dans un type particulier de neurones olfactifs de la drosophile dits « codeurs » ou « vides » présents chez le mutant $\Delta ab3A$ (Hallem *et al*, 2004): ces neurones n'expriment plus leur OR endogène, mais expriment toujours le co-récepteur nécessaire Orco. L'établissement de lignées Gal4/UAS-SlitOR a permis de générer des lignées de drosophiles exprimant chacune un type de SlitOR à la place de l'OR endogène, et ce uniquement dans les neurones d'un seul type sensillaire (ab3A). L'analyse de la réponse spécifique de ces sensilles nécessite l'utilisation de l'électrophysiologie mono-sensillaire (mesure de l'activité électrique d'une seule sensille à la fois), par laquelle l'activité électrique de la sensille ciblée est mesurée sous forme de potentiels d'action.

Les lignées ont été stimulées avec un panel d'odorants de nature chimique variée biologiquement actifs chez *S. littoralis*, induisant différents comportements indispensables à la reproduction et à la recherche de la plante hôte : les constituants de la phéromone sexuelle (6 acétates en C14 saturés et insaturés), utilisés par le mâle pour s'orienter vers la femelle et la choisir, et des composés phéromonaux hétérospécifiques (alcool en C14) qui repoussent l'adulte et participe à l'isolement reproducteur ; des volatils attractifs de coton, naturels (α -humulène, β -caryophyllène) ou induits par l'action d'herbivores (α -farnésène, indol, linalool, Z3-hexenylacétate) ; des volatils de fleurs attractifs (e.g. géranol) ; ainsi que des inhibiteurs d'oviposition (le benzaldéhyde et cinq terpènes identifiés dans les excréments de chenilles de l'espèce: carvacrol, eugenol, nerolidol, thymol et phytol), soit un total de 51 composés.

RÉSULTATS

REPERTOIRE D'OR CHEZ *S. LITTORALIS*

L'analyse du transcriptome antennaire a permis d'identifier une cinquantaine d'OR potentiels exprimés chez *S. littoralis* (Legeai *et al*, 2011; Jacquin-Joly *et al*, 2012; Poivet *et al*, 2013). La comparaison entre adultes mâles et femelles montre que certains récepteurs sont spécifiques des mâles, ils pourraient donc être impliqués dans la reconnaissance des phéromones sexuelles émises par les femelles. La comparaison entre adultes et chenilles révèle que les adultes expriment un plus grand nombre de récepteurs que les chenilles, le répertoire des chenilles ne montrant pas d'OR spécifique du stade larvaire (Poivet *et al*, 2013). Enfin, le séquençage récent et l'analyse du génome de *S. littoralis* a permis d'élargir le répertoire à plus de 70 OR.

ETUDE FONCTIONNELLE DES OR DE *S. LITTORALIS*

Plus de la moitié des OR identifiés dans le transcriptome ont pu être exprimés dans les antennes de drosophile. Des ligands ont été identifiés pour une vingtaine d'entre eux (de Fouchier *et al*, 2017). Comme attendu, on retrouve les règles de la combinatoire olfactive commune aux insectes et aux mammifères: un OR peut reconnaître plusieurs odorants, un odorant peut être reconnu par plusieurs OR. Ainsi, un répertoire de quelques dizaines de récepteurs peut détecter plusieurs milliers d'odorants. Par ailleurs, les OR présentent des spectres de réponse variés : certains reconnaissent une vaste palette d'odorants, d'autres sont beaucoup plus spécifiques, en particulier ceux impliqués dans la reconnaissance d'odeurs clés comme les phéromones sexuelles par exemple (Montagne *et al*, 2012; de Fouchier *et al*, 2015; de Fouchier *et al*, 2017).

DISCUSSION

Les approches « omiques » utilisées ici ont permis d'établir le premier transcriptome antennaire d'un papillon ravageur en 2011 (Legeai *et al*, 2011). Cette approche s'est révélée très efficace pour identifier un large répertoire d'OR chez une espèce sans génome disponible. Depuis, une telle stratégie a été appliquée à de nombreux autres insectes ravageurs, en parallèle au développement des technologies de séquençage à haut débit (next generation sequencing ou NGS)(Montagne *et al*, 2015). Le séquençage et l'analyse du génome de *S. littoralis* nous a permis d'élargir le répertoire et d'identifier plus de 70 OR chez cette espèce, ce que l'on considère comme un répertoire complet par comparaison à ce qui est connu chez les autres papillons. Aujourd'hui, de nombreuses initiatives, telles l'initiative i5K qui vise à séquencer le génome de 5000 espèces d'insectes (Consortium i5K, 2013) apportent de nombreuses données génomiques sur les OR d'insectes.

Face à cette explosion de données, le challenge actuel est la caractérisation des transcrits et des gènes identifiés. Nous avons montré que le système d'expression en antennes de drosophile peut être appliqué à la caractérisation fonctionnelle *de novo* d'OR d'espèces d'ordres différents de celui des diptères. En effet, jusqu'alors, ce système n'avait été utilisé que pour l'étude d'OR de drosophile ou de moustique (Hallem *et al*, 2004; Kreher *et al*, 2005; Hallem et Carlson 2006; Carey *et al*, 2010; Wang *et al*, 2010), tous deux de l'ordre des diptères. Ainsi, ce système a le potentiel pour être adapté à une diversité d'espèces.

Par la construction d'une phylogénie des OR de *S. littoralis* avec des séquences d'OR de Lépidoptères trouvées dans les bases de données, et en y associant leur ligands odorants préférentiels, nous avons pu montrer une certaine conservation de fonction : les OR à la base de l'arbre sont dédiés à la reconnaissance des composés aromatiques, tandis que pour les branches les plus récentes de l'arbre, nous trouvons des récepteurs impliqués dans la détection de composés aliphatiques, comme par exemple les phéromones sexuelles. Une telle relation structure/fonction est inédite chez les insectes où il est le plus souvent admis que la séquence protéique d'un OR ne permet pas d'en déduire sa fonction. Enfin, parmi les OR identifiés, nous avons mis le doigt sur des récepteurs clés impliqués dans des comportements vitaux, tels la reconnaissance sexuelle par phéromone ou bien l'évitement alimentaire. Leur modélisation ouvrira la voie à la recherche d'agonistes ou d'antagonistes, capables d'activer ou de bloquer ces récepteurs clés à la demande.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons caractérisé le premier large répertoire d'OR chez un herbivore. Nos résultats permettent non seulement la mise en évidence d'OR clés à cibler dans des stratégies de lutte, mais aident aussi à comprendre comment un insecte mobilise un répertoire de récepteurs adapté à son écologie.

REMERCIEMENTS

Nous remercions toutes les personnes ayant participé à ce travail à l'INRA de Versailles (Marie-Christine François, Christelle Monsempes, Erwan Poivet, Pascal Roskam), à l'Université Paris 06 (Annick Maria, Claudia Steiner, Thomas Chertemps), à l'Université d'agriculture de Suède (Peter Anderson, Fredrik Schlyter), à l'Institut Max Planck de Jena en Allemagne (Bill Hansson). Nous remercions également les organismes financeurs, en particulier l'ANR (ANR-16-CE21-0002-01, ANR-16-CE02-0003-01), le département Santé des plantes et environnement de l'INRA (Appel à projet SPE et AIP Bioressources) et le Swedish Science and Research Council (Suède).

BIBLIOGRAPHIE

- Carey A.F., Wang G., Su C.Y., Zwiebel L.J., Carlson J.R., 2010 - Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature*, 464, 66-71.
- Consortium i5K, 2013 - The i5K Initiative: advancing arthropod genomics for knowledge, human health, agriculture, and the environment. *J Hered*, 104, 595-600.
- de Fouchier A., Sun X., Monsempes C., Mirabeau O., Jacquin-Joly E., Montagné M., 2015 - Evolution of two receptors detecting the same pheromone compound in crop pest moths of the genus *Spodoptera*. *Front Ecol Evol*, 3, 95.
- de Fouchier A., Walker III W.B., Montagné N., Steiner C., Binyameen M., Schlyter F., Chertemps T., Maria A., François M.C., Monsempes C., *et al*, 2017 - Functional evolution of Lepidoptera olfactory receptors revealed by deorphanization of a moth repertoire. *Nature Communications*, in press.
- Gonzalez F., Witzgall P., Walker III W.B., 2016 - Protocol for Heterologous Expression of Insect Odourant Receptors in *Drosophila*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4, 24.
- Hallem E.A., Carlson J.R., 2006 - Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell*, 125, 143-160.
- Hallem E.A., Ho M.G., Carlson J.R., 2004 - The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell*, 117, 965-979.
- Jacquin-Joly E., Legeai F., Montagné N., Monsempes C., François M.C., Poulain J., Gavory F., Walker III W.B., Hansson B.S., Larsson M.C., 2012 - Candidate chemosensory Genes In Female Antennae Of The Noctuid Moth *Spodoptera littoralis*. *Int J Biol Sci*, 8, 1036.
- Kreher S.A., Kwon J.Y., Carlson J.R., 2005 - The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* larva. *Neuron*, 46, 445-456.
- Legeai F., Malpel S., Montagne N., Monsempes C., Cousserans F., Merlin C., François M.C., Maibèche-Coisne M., Gavory F., Poulain J., *et al*, 2011 - An Expressed Sequence Tag collection from the male antennae of the Noctuid moth *Spodoptera littoralis*: a resource for olfactory and pheromone detection research. *BMC Genomics*, 12, 86.
- Maibèche M., Jacquin-Joly E., 2014 - *Spodoptera littoralis*, la noctuelle méditerranéenne du coton. *Nuisibles et Parasites Informations*, 87, 23-28.
- Maibèche M., Jacquin-Joly E., Blais C., 2014 - Le système sensoriel des insectes. *Nuisibles et Parasites Informations*, 85, 23-26.
- Montagne N., Chertemps T., Brigaud I., François A., François M.C., de Fouchier A., Lucas P., Larsson M.C., Jacquin-Joly E., 2012 - Functional characterization of a sex pheromone receptor in the pest moth *Spodoptera littoralis* by heterologous expression in *Drosophila*. *Eur J Neurosci*, 36, 2588-2596.
- Montagne N., de Fouchier A., Newcomb R.D., Jacquin-Joly E., 2015 - Advances in the identification and characterization of olfactory receptors in insects. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 130, 55-80.
- Poivet E., Gallot A., Montagne N., Glaser N., Legeai F., Jacquin-Joly E., 2013 - A comparison of the olfactory gene repertoires of adults and larvae in the noctuid moth *Spodoptera littoralis*. *PLoS ONE*, 8, e60263.
- Salama H.S., Dimetry N.Z., Salem S.A., 1970 - On the host preference and biology of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *Zeitung für Angewandte Entomologie*, 67, 261-266.
- Wang G., Carey A.F., Carlson J.R., Zwiebel L.J., 2010 - Molecular basis of odor coding in the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4418-4423.
- Witzgall P., Kirsch P., Cork A., 2010 - Sex pheromones and their impact on pest management. *J Chem Ecol*, 36, 80-100.