

ÉCOLE DOCTORALE SST
GLYCOBIOLOGIE DE L'OLFACTION

THÈSE présentée par :
Fanny BRIMAU

soutenue le : 14 décembre 2010

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais-Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**ROLE DES ODORANT-BINDING PROTEIN DANS LE
MECANISME DE TRANSDUCTION OLFACTIVE:
IMPLICATION DE MODIFICATIONS POST-
TRADUCTIONNELLES DYNAMIQUES DANS LA SPECIFICITE
DE LIAISON AVEC LES LIGANDS**

THÈSE dirigée par :

Mme NAGNAN-LE MEILLOUR Patricia
M. CHEMINEAU Philippe

Directeur de Recherche, INRA, Lille1
Directeur de Recherche, INRA

RAPPORTEURS :

M. LEFEBVRE Tony
M. LEGRAND Dominique

Professeur, Université Lille 1
Chargé de Recherche HDR, CNRS, Lille1

JURY :

Mme DUITTOZ Anne
M. LEFEBVRE Tony
M. LEGRAND Dominique
Mme NAGNAN-LE MEILLOUR Patricia

Professeur, Université François Rabelais,
Professeur, Université Lille 1
Chargé de Recherche HDR, CNRS, Lille1
Directeur de Recherche, INRA, Lille1

Remerciements

Je remercie le Docteur Jean-Claude Michalski pour m'avoir accueillie au sein de l'unité de **Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle** à Lille.

Je tiens à remercier le Docteur Patricia Nagnan-Le meillour qui a dirigé ces travaux. Tu m'as fait découvrir un autre univers que je ne connaissais pas, l'olfaction, et l'opportunité de travailler sur un sujet de thèse passionnant sur les OBPs porcines. Merci de ton soutien et de la confiance que tu m'as apporté durant ma thèse. Et également à mon autre directeur de thèse, le Docteur Philippe Chemineau pour son soutien dans ce projet.

Je suis particulièrement reconnaissante au Professeur Tony Lefèbvre et au Docteur Dominique Legrand pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je remercie également le Professeur Anne Duittoz pour m'avoir fait l'honneur d'être le président de ce jury.

Je remercie les collaborateurs de cette thèse, Philippe Lagant, Yves Leroy, Tony Lefèbvre, Arnaud Leroy et le Professeur Jean-Paul Cornard. Un grand merci à Jean-Paul, qui a été mon initiateur pour la spectroscopie de fluorescence. Ta patience, ta gentillesse et ton soutien m'ont beaucoup apporté durant ces 3 années de thèse. Mes remerciements vont également au Docteur Chrystelle Le Danvic qui a été présente pour moi tout au long de ma thèse.

Je garde un agréable souvenir pour les moments passés et discussions intéressantes avec les personnes du 1^{er} étage au coin repas. Un grand merci dans un premier temps à Yannick Rossez pour avoir été présent pour moi en début de thèse....Et à Coralie, Esthelle, Adeline, Marie-Esthelle, Aurélie, Stéphanie, Stéphanie du C5, Christophe, Ayoub, Romain, Yohan,... pour les cafés, les soirées, pour votre soutien et pour m'avoir fait découvrir une ambiance et une ville que je ne connaissais pas. Un énorme merci à vous tous.

Je suis arrivée dans le bâtiment C9 avec tristesse car je partais loin de chez moi mais je vais repartir du bâtiment C9 également avec tristesse. Je suis reconnaissante à l'ensemble du personnel du C9 pour m'avoir accueillie et je vous en remercie.

Même en étant loin d'eux, je remercie mon premier laboratoire à l'INRA de Tours dirigé par Philippe Monget. Tu m'as donné l'envie de faire de la recherche. Et j'ai toujours été bien accueillie au sein de ton laboratoire quand je revenais faire des courts séjours, merci aussi à Charlène Ricco, Camille Meslin, Danielle Monniaux, Martine Bontoux, Stéphane Fabre et Gwenn-Aël Carré pour votre accueil à Tours.

Ma famille a toujours été présente pour me soutenir dans cette épreuve. Au départ, j'avais dans l'idée de faire des études courtes et 8 ans après je m'apprête à passer mon doctorat en biologie. Merci de m'avoir soutenue pendant mes 3 ans de thèse et surtout merci de m'avoir supportée pendant la dernière année. Un clin d'œil tout spécial à la personne qui vie avec moi tous les week-end, la thèse se termine et tu auras plus à supporter mes changements d'humeur (des rires aux larmes) bien longtemps encore. Merci à ma belle-famille pour les agréables séjours à la compagne. Une pensée pour finir à mes amies Audrey et Sophie pour votre présence auprès de moi depuis notre rencontre à l'université de Tours.

Résumé

Les **OBP** sont des petites protéines solubles qui se lient avec **des molécules odorantes et phéromonales**. Le rôle des OBPs n'est pas complètement compris. Une hypothèse suggère que l'OBP solubilise et transporte les ligands aux récepteurs olfactifs et la liaison entre les molécules odorantes et l'OBP est non spécifique. Une autre hypothèse suggère que le complexe formé est une liaison spécifique entre une molécule odorante donnée et une OBP spécifique. Ce travail de thèse montre que les OBPs sont impliquées dans la première étape de **la discrimination des odeurs**. Dans un premier temps, nous avons montré l'implication de la Phe35 et la Tyr 82 dans la sortie du ligand par l'OBP. Dans un second temps, nous avons mis en évidence la présence de différentes isoformes d'**OBP** et de **VEG** qui diffèrent par **les modifications post-traductionnelles (phosphorylation et GlcNAcylation)** a la fois sur **les protéines natives** extraites de la muqueuse respiratoire et sur **les protéines recombinantes** produites par *P.pastoris* et CHO. Ces isoformes sont capables de discriminer des molécules odorantes et phéromonales. Les OBPs ne sont pas des transporteurs passifs car elles assurent un fin codage des molécules odorantes ou phéromonales avant l'interaction de ce complexe avec un récepteur spécifique.

Mots-clefs : olfaction, Odorant-Binding Protein, Von Ebner's Gland Protein, modifications post-traductionnelles, phosphorylation, O-N-acétylglucosaminylation, cartographie peptidique, western-blot, BEMAD, spectroscopie de fluorescence.

Résumé en anglais

OBPs are small soluble proteins that bind with **odorant molecules and pheromones**. The role of OBP is not completely understood. A hypothesis suggests that OBP solubilize and transport the ligands to olfactory receptors and the binding between odorant molecule and OBP is unspecific. An other hypothesis suggest that the complex formed is the specific binding between a given odorant molecule and a specific OBP. This work of thesis show that OBP are involved in the first step of **odorant discrimination**. Initially, we have showed the involvement of the Phe35 and Tyr 82 in the uptake of ligands by OBP. Second, we have given rise to the presence of various isoform of **OBP** and **VEG** that differ by **post-translational modifications (phosphorylation and GlcNAcylation)** both on **natives proteins** extract of respiratory mucosa and on **recombinants proteins** produce by *P. pastoris* and CHO. These isoforms are able to discriminate of odorant molecules and pheromones. OBPs are not passives carriers because they ensure a fine coding of odorant molecules and pheromones before interaction of this complex with specific receptor.

Key-words: olfaction, odorant-binding protein, Von Ebner's Gland Protein, post-translational modifications, phosphorylation, *O*-N-acetylglucosaminylation, peptide mapping, western-blot, BEMAD, fluorescence spectroscopy.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	3
Résumé en anglais	4
Table des matières	5
Liste des Tableaux	7
Liste des Figures	8
Liste des Annexes	9
Liste des Abréviations	12
Liste des travaux personnels	14
Introduction	16
I. La communication chimique chez le porc, <i>Sus scrofa</i>	17
I. a. Données économiques	17
I. b. Les signaux chimiques et leur rôle dans le comportement	17
I. c. Le système olfactif	19
I. c. 1. Le système olfactif principal	20
I. c. 2. Le système olfactif accessoire ou organe voméronasal	21
I. c. 3. Les récepteurs olfactifs	22
I. c. 4. La transduction des signaux olfactifs	22
II. Les protéines de liaison chez le porc	25
II. a. Les lipocalines	25
II. b. Structure, localisation et sites d'expression des protéines de liaison	27
porcines	27
II. b. 1. L'OBP porcine	27
II. b. 2. La SAL (Salivary Lipocaline)	29
II. b. 3. La VEG (Von Ebner's Gland protein)	32
II. b. 4. Comparaison des trois protéines	34
II. c. Propriétés de liaison de l'OBP, de la SAL et de la VEG	35
II. c. 1. Le test de liaison sur filtre	35
II. c. 2. Le test de liaison en chambre de diffusion de vapeurs	36
II. c. 2. Le test de liaison sur gel	36
II. c. 3. La spectroscopie de fluorescence	37
III. Les modifications post-traductionnelles	39
III. a. La <i>O</i> -N-acétylglucosaminylation	40
III. a. 1. Les sites de <i>O</i> -GlcNac	41
III. a. 2. Les enzymes de la <i>O</i> -GlcNac	41
III. a. 2. α . OGT : structure, caractéristiques et régulation	42
III. a. 2. β . OGA: structure, caractéristiques et régulation	44
III. a. 3. L'UDP-GlcNac, substrat de l'OGT	46
III. b. Les phosphorylations	47
III. b. 1. Les sites de phosphorylation	47
III. b. 2. Les enzymes des phosphorylations	48
III. b. 2. α . Les protéines kinases	48
III. b. 2. β . Les protéines phosphatases	50
III. b. 3. L'ATP substrat des protéines kinases	53
III. c. Le Yin Yang : GlcNacylation et phosphorylation	54
III. d. Les rôles de la GlcNacylation et de la phosphorylation	55

III. d. 1. La régulation dans l'expression des protéines et dans le cycle cellulaire associé aux MPT	55
III. d. 2. Les pathologies associées aux MPT	57
III. d. 3. La GlcNacylation associée à l'olfaction	58
Chapitre 1 : Etude des relations structure/fonction de l'OBP porcine recombinante	59
I. Contexte et objectifs	59
II. Résultats et discussion	60
Chapitre 2 : Identification et localisation des phosphorylations de l'OBP et de la VEG de la muqueuse respiratoire de porcelet	62
I. Contexte et objectifs	62
II. Résultats et discussion	63
Chapitre 3 : La spécificité de liaison des isoformes d'Odorant-Binding Protein recombinante est gouvernée par la phosphorylation	65
I. Contexte et objectifs	65
II. Résultats et discussion	66
Chapitre 4 : Purification, identification et propriétés fonctionnelles des isoformes de VEG et d'OBP de la muqueuse respiratoire	69
I. Contexte et objectifs	69
II. Purification des protéines par HPLC en échange d'anions	69
III. Immunodétection de l'OBP et de la VEG	70
IV. Identification des isoformes purifiées par cartographie peptidique	71
V. Immunodétection des modifications post-traductionnelles	75
V. a. Phosphorylations	75
V. b. <i>O</i> -GlcNac	76
VI. Localisation des sites de phosphorylation et de <i>O</i> -GlcNac	77
VI. a. Cartographie des sites de phosphorylation	78
VI. b. Cartographie des sites de <i>O</i> -GlcNac	80
VII. Propriétés de liaison des fractions étudiées par spectroscopie de fluorescence	84
VII. a. Fixation de l'1-AMA par les protéines contenues dans les fractions 8 à 10	84
VII. b. Déplacements de la sonde fluorescente	86
VII. c. Analyse de la composition des fractions 9 et 10 par PAGE	87
Discussion	89
I. Comparaison des patrons de phosphorylation des OBP natives et recombinantes	91
II. Le rôle de la phosphorylation et de la glycosylation dans les propriétés de liaison de l'OBP	92
III. La VEG	95
IV. Les voies de biosynthèse de la modification des OBP	99
Conclusion et perspectives	102
Bibliographie	104
Annexe 1	123
Annexe 2	131
Annexe 3	139

Liste des Tableaux

- Tableau 1** : Cartographie peptidique des fractions 4, 4a, 4b et 5 correspondant à la VEG
- Tableau 2** : Cartographie peptidique des fraction 8 et 8a correspondant à l'OBP
- Tableau 3** : Cartographie peptidique des fractions 9 et 10 contenant l'OBP et la VEG en mélange
- Tableau 4** : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 8 (SDS-PAGE) contenant l'OBP seule par BEMAD
- Tableau 5** : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 8a (SDS-PAGE) contenant l'OBP seule par BEMAD
- Tableau 6** : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 9 (SDS-PAGE) contenant l'OBP et la VEG pleine taille en mélange, par BEMAD
- Tableau 7** : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 10 (SDS-PAGE) contenant l'OBP et la VEG pleine taille en mélange, par BEMAD
- Tableau 8** : Localisation des sites de *O*-N-acetylglucosaminylation de la fraction 8 (SDS-PAGE) contenant l'OBP par BEMAD
- Tableau 9** : Localisation des sites de *O*-N-acetylglucosaminylation de la fraction 8a (SDS-PAGE) contenant l'OBP par BEMAD
- Tableau 10** : Localisation des sites de *O*-N-acetylglucosaminylation de la fraction 9 (SDS-PAGE) contenant l'OBP et la VEG en mélange, par BEMAD
- Tableau 11** : Localisation des sites de *O*-N-acetylglucosaminylation de la fraction 10 (SDS-PAGE) contenant l'OBP et la VEG en mélange, par BEMAD
- Tableau 12** : Valeurs des IC₅₀ et des constantes de dissociation calculées relatives aux tests de liaison par déplacement
- Tableau 13** : Cartographie des phosphorylations des différentes formes d'OBP étudiées dans ce travail
- Tableau 14** : Affinité (exprimée par le K_d en μM) des différentes isoformes d'OBP pour les stéroïdes sexuels et les composants de la SAP
- Tableau 15** : Récapitulatif des sites de phosphorylation et de *O*-GlcNac identifiés par la technique du BEMAD
- Tableau 16**: Récapitulatif des sites de MPT localisés sur la séquence primaire de la VEG contenue dans les fractions 9 et 10

Liste des Figures

- Figure 1** : Structure chimique des composants de la phéromone sexuelle de porc
- Figure 2** : Structure chimique des composants de la substance apaisante porcine (SAP)
- Figure 3** : Coupe sagittale d'une tête de porc
- Figure 4** : Schéma représentant l'organe voméronasal de mammifères
- Figure 5** : Schéma des événements extracellulaires et intracellulaires impliqués dans la transduction olfactive
- Figure 6** : Séquences nucléotidique et protéique de l'OBP
- Figure 7** : Structure tridimensionnelle de l'OBP avec le ligand co-cristallisé, l'undécanal
- Figure 8** : Séquences nucléotidique et protéique de la SAL
- Figure 9** : Structure tridimensionnelle de la SAL
- Figure 10** : Séquences nucléotidique et protéique de la VEG de la muqueuse respiratoire.
- Figure 11** : Alignement des séquences protéiques de l'OBP, de la SAL et de la VEG
- Figure 12** : Structure chimique de l'1-aminoanthracène
- Figure 13** : Schéma représentant la mise en place de complexité du protéome s'établissant au cours des étapes successives conduisant à la synthèse des protéines
- Figure 14** : Représentation schématique d'un polypeptide modifié par GlcNAcylation
- Figure 15** : La GlcNAcylation, une modification post-traductionnelle dynamique et réversible
- Figure 16** : Mécanisme de régulation possible de l'OGT
- Figure 17** : Représentation schématique des deux isoformes de l'OGA (130 kDa et 75 kDa) et ses domaines *O*-GlcNAcase et HAT (Histone AcétylTransférase).
- Figure 18** : La voie de biosynthèse des hexosamines
- Figure 19** : Représentation schématique d'un polypeptide modifié par phosphorylation
- Figure 20** : La phosphorylation, une modification post-traductionnelle dynamique et réversible
- Figure 21** : La protéine kinase A de Souris
- Figure 22** : Classification des phosphatases chez les eucaryotes
- Figure 23** : Chaîne respiratoire mitochondriale
- Figure 24** : Séparation des protéines de la muqueuse respiratoire par HPLC sur colonne échangeuse d'anions
- Figure 25** : Immunodétection de la VEG et de l'OBP dans les fractions issues de la séparation par HPLC
- Figure 26** : Immunodétection des phosphorylations portées par les fractions séparées par HPLC
- Figure 27** : Immunodétection de la présence de *O*-GlcNac dans les fractions séparées par HPLC
- Figure 28** : Spécificité du marquage avec les anticorps RL2
- Figure 29** : Titration des fractions 8, 8a, 9 et 10 par l' 1-AMA
- Figure 30** : Courbes de compétition entre l' 1-AMA lié aux protéines et les cinq ligands
- Figure 31** : Electrophorèse en conditions natives (PAGE) des fractions 9 et 10
- Figure 32** : Structure du gène codant la VEG montrant la position des acides aminés manquant dans les exons 2 et 3
- Figure 33** : Comparaison des sites de phosphorylation de l'OBP et de la VEG
- Figure 34** : Schéma des voies métaboliques hypothétiques pouvant expliquer la modification des OBP par la *O*-GlcNac

Liste des annexes

ANNEXE 1 :

Annexe 1-A : Cartographie peptidique de la fraction 4.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 4 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides sont élués avec différents pourcentage d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).

Annexe 1-B : Cartographie peptidique de la fraction 4a.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 4a obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides sont élués avec différents pourcentage d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).

Annexe 1-C : Cartographie peptidique de la fraction 4b.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 4b obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides sont élués avec différents pourcentage d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).

Annexe 1-D : Cartographie peptidique de la fraction 5.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 5 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides sont élués avec différents pourcentage d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).

Annexe 1-E : Cartographie peptidique de la fraction 8.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 8 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides sont élués avec différents pourcentage d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).

Annexe 1-F : Cartographie peptidique de la fraction 8a.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 8a obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides sont élués avec différents pourcentage d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).

Annexe 1-G : Cartographie peptidique de la fraction 9.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 9 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides sont élués avec différents pourcentage d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).

Annexe 1-H : Cartographie peptidique de la fraction 10.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 10 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides sont élués avec différents pourcentage d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).

ANNEXE 2 :

Annexe 2-A : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 8.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 8. **a** – Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T. **b** – Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T+CT.

Annexe 2-B : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 8a.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 8a. **a** – Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T. **b** – Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T+CT.

Annexe 2-C : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 9.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 9. **a** – Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T. **b** – Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement CT. **c** – Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T+CT.

Annexe 2-D : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 10.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 10. **a** – Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T.

Annexe 2-E : Localisation des sites de O-N-acétylglucosaminylation de la fraction 8.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 8. **a** – Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T. **b** – Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T+CT.

Annexe 2-F : Localisation des sites de O-N-acétylglucosaminylation de la fraction 8a.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 8a. **a** – Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T. **b** – Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement CT. **c** - Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T+CT. **d** - Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T+CT.

Annexe 2-G : Localisation des sites de O-N-acétylglucosaminylation de la fraction 9.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 9. **a** – Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T. **b** – Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T. **c** - Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T+CT. **d** - Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T+CT. **e** - Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T+CT.

Annexe 2-A : Localisation des sites de O-N-acétylglucosaminylation de la fraction 10.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 10. **a** – Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T. **b** – Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T. **c** - Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement CT. **d** - Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T+CT. **e** - Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T+CT.

ANNEXE 3 :

Annexe 3-A : Courbes de titration de la fraction 8 (a), de la fraction 8a (b), de la fraction 9 (c) et de la fraction 10 (d) avec des concentrations croissantes d'AMA : de 0 à 6 μM pour la fraction 8 et 8a et de 0 à 15 μM pour les fractions 9 et 10 dans un tampon Tris.

Annexe 3-B : Spectres de fluorescence des tests de compétition avec la fraction 8.

a-testostérone, **b**-androsténone, **c**-androsténol, **d**-acide palmitique et **e**-acide myristique. La concentration de la fraction est de 1 μM et celle de l'AMA de 2 μM . Le ligand est ajouté à des concentrations croissantes de 0 à 6 μM . La flèche indique la diminution de la fluorescence concordant avec l'augmentation de la concentration du ligand.

Annexe 3-C : Spectres de fluorescence des tests de compétition avec la fraction 8a.

a-testostérone, **b**-androsténone, **c**-androsténol, **d**-acide palmitique et **e**-acide myristique. La concentration de la fraction est de 1 μM et celle de l'AMA de 2 μM . Le ligand est ajouté à des concentrations croissantes de 0 à 6 μM . La flèche indique la diminution de la fluorescence concordant avec l'augmentation de la concentration du ligand.

Annexe 3-D : Spectres de fluorescence des tests de compétition avec la fraction 9.

a-testostérone, **b**-androsténone, **c**-androsténol, **d**-acide palmitique et **e**-acide myristique. La concentration de la fraction est de 2,5 μM et celle de l'AMA de 3,75 μM . Le ligand est ajouté à des concentrations croissantes de 0 à 6 μM . La flèche indique la diminution de la fluorescence concordant avec l'augmentation de la concentration du ligand.

Annexe 3-E : Spectres de fluorescence des tests de compétition avec la fraction 10.

a-testostérone, **b**-androsténone, **c**-androsténol, **d**-acide palmitique et **e**-acide myristique. La concentration de la fraction est de 2,5 μM et celle de l'AMA de 3,75 μM . Le ligand est ajouté à des concentrations croissantes de 0 à 6 μM . La flèche indique la diminution de la fluorescence concordant avec l'augmentation de la concentration du ligand.

Liste des Abréviations

1-AMA	1-aminoanthracène
AGP	Alpha-1-acid glycoprotein
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANS	8-anilino-1-naphtalène
AP	Acide palmitique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BEMAD	β -élimination suivie d'ajout de DTT par addition de Michael
CHO	Chinese Hamster Ovary
CTD de l'ARN pol II	Domaine C-terminal de l'ARN polymérase II
DAUDA	Acide undécanoïque 11-(5-(diméthylamino)-1-naphtalène-sulfonylamino
DSP-PTP	Dual specificity - phosphotyrosine protein phosphatase
DTT	Dithiotréitol
ECL	Enhanced ChemiLuminescent
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry
GFAT	Glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase
HAT	Histone acétyltransférase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBMP	2-isobutyl-3-méthoxypyrazine
Kd	Constante de dissociation
ncOGT	nuclear and cytoplasmic OGT
mOGT	mitochondrial OGT
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry
MO	Muqueuse olfactive
MR	Muqueuse respiratoire
MPT	Modification post-traductionnelle
MUP	Major Urinary Protein
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
OBP :	Olfactory-Binding Protein ou Odorant-Binding Protein
OGA :	N-acétyl- β -D-glucosaminidase
O-GlcNAc :	O-N-acétylglucosamine
O-GlcNAcylation :	O-N-acétylglucosaminylation
OGT :	β -N-acétylglucosaminyltransférase
OVN :	Organe voméronasal
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PBP :	Pheromone Binding Protein
PP1 :	Protéine phosphatase de type 1
PP2	Protéine phosphatase de type 2
PPM :	Phosphoprotein phosphatase M
PPP :	Phosphoprotein phosphatase P
PSP :	Phosphoserine/threonine protein phosphatase
PTP :	Phosphotyrosine protein phosphatase
RBP :	Retinol-binding protein
RER :	Reticulum endoplasmique rugueux
RO :	Récepteur olfactif

RT-PCR :	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
sOGT :	small OGT
SOP :	Système olfactif principal
SAL :	Salivary Lipocaline
SAP :	Substance apaisante porcine
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TL :	Tear Lipocaline
TPR :	Tetratricopeptides repeats
VEG :	Von Ebner's Gland protein
UDP-GlcNAc :	5'-diphospho-N-acétylglucosamine
VR :	Vomer nasal receptor

Liste des acides aminés et leurs abréviations:

Nom des acides aminés	Code à 1 lettre	Code à 3 lettres
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate ou acide aspartique	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamate ou acide glutamique	E	Glu
Glutamine	Q	Gln
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

Liste des travaux personnels

L'ensemble des travaux menés au cours de ma thèse a conduit aux publications et communications suivantes :

Publications scientifiques

2009- Nagnan-Le Meillour P., Lagant P., Cornard J.-P., Brimau F., Le Danvic C., Vergoten G. & Michalski J.-C. Phenylalanine 35 and tyrosine 82 are involved in the uptake and release of ligand by porcine odorant-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta-Proteins and Proteomics*, 1794:1142-1150.

2009- Nagnan-Le Meillour P., Le Danvic C., Brimau F., Chemineau P. & Michalski J.-C. Phosphorylations of native porcine olfactory binding proteins. *J. Chem. Ecol.*, 35:752-760.

2010- Brimau F., Cornard J.-P., Le Danvic C., Lagant P., Vergoten G., Grebert D., Pajot E. & Nagnan-Le Meillour P. Binding specificity of recombinant odorant-binding protein isoforms is driven by phosphorylation. *J. Chem. Ecol.*, 36:801-813.

2010- Meslin C., Brimau F., Nagnan-Le Meillour P., Callebaut I., Pascal G., & Monget P. Positive selection acting on odorant-binding protein genes : a step toward speciation. Soumis à *BMC Evol. Biol.*

Communications orales (nom de l'intervenant en gras)

2008- **Brimau F.**, Lagant P., Cornard J.-P., Le Danvic C., Vergoten G., Chemineau P., Michalski J.-C. & Nagnan-Le Meillour P. Rôle des odorant-binding protein dans le mécanisme de transduction olfactive: implication de modifications post-traductionnelles dans la spécificité de liaison avec les ligands. Communication orale, 13^{ème} journée des thésards de la PRC, INRA, Tours.

2009- **Meslin C.**, Brimau F., Nagnan-Le Meillour P. & Monget P. Identification de gènes à évolution rapide et soumis à sélection positive. L'exemple des protéines de liaison des odeurs sexuelles. Communication orale, JAS PHASE, 7-8 octobre, Tours.

2009- **Nagnan-Le Meillour P.**, Brimau F., Le Danvic C., Chemineau P. & Michalski J.-C. Le rôle des OBP dans le codage des composés phéromonaux chez le Porc. Communication orale, 6^{ème} réunion du GDR Ecologie Chimique, 27-28 octobre, Marseille.

2010- **Nagnan-Le Meillour P.**, Brimau F. & Le Danvic C. Odorant-Binding Proteins as an example of convergent evolution: but do they have really the same function? Communication orale, 26th annual meeting of the International Society of Chemical Ecology, 31 juillet-4 août, Tours, France.

Communications affichées

2009- **Brimau F.**, Le Danvic C., Chemineau P. Michalski J.-C. & Nagnan-Le Meillour P. Identification et localisation des phosphorylations de l'OBP et de la VEG porcines. Poster, JAS PHASE, 7-8 octobre, Tours.

2009- **Le Danvic C.**, Lagant P., Cornard J.-P., Brimau F., Vergoten G. & Michalski J.-C. Phenylalanine 35 and tyrosine 82 are involved in the uptake and release of ligands by porcine odorant-binding protein. Poster, 25th annual meeting of the International Society of Chemical Ecology, 23-27 août, Neuchatel, Suisse.

2009- **Brimau F.**, Nagnan-Le Meillour P., Le Danvic C., Chemineau P. & Michalski J.-C. Phosphorylations of native porcine olfactory binding proteins. Poster, 25th annual meeting

of the International Society of Chemical Ecology, 23-27 août, Neuchatel, Suisse. Prix du Poster.

2010- Brimau F., Cornard J.-P., Le Danvic C., Lagant P., Vergoten G., Grebert D., Pajot E. & **Nagnan-Le Meillour** P. Binding specificity of recombinant odorant-binding protein isoforms is driven by phosphorylation. Poster, 26th annual meeting of the International Society of Chemical Ecology, 31 juillet-4 août, Tours, France.

2010- **Meslin** C., Brimau F., Leroy A., Pascal G., Nagnan-Le Meillour P. & Monget P. Identification et rôle fonctionnel des acides aminés sous sélection positive des Odorant Binding Proteins: implication dans la spéciation. Poster, Journées d'Animation Crédits Incitatifs (JACI) du Département PHASE, 11-12 octobre, Tours, France.

2010- Brimau F., Cornard J.-P., Le Danvic C., Lagant P., Vergoten G., Grebert D., Pajot E. & **Nagnan-Le Meillour** P. Etude des modifications post-traductionnelles des OBP exprimées en lignée cellulaire CHO. Poster, Journées d'Animation Crédits Incitatifs (JACI) du Département PHASE, 11-12 octobre, Tours, France.

Introduction

Mon travail de thèse se situe dans le domaine de l'Ecologie Chimique. Cette discipline a pour sujet d'étude la communication entre organismes, au travers de l'échange de signaux chimiques. Ce mode de communication est ubiquiste, on le rencontre chez les bactéries, les plantes et les animaux (Cassier *et al.*, 2000). Chez ces derniers, la réception des signaux chimiques implique les systèmes olfactifs et gustatifs. Les signaux chimiques sont désignés "phéromones" lorsqu'il s'agit de relations intra-spécifiques (Karlson & Lüscher, 1959) et "allélochimiques" dans le cas de relations inter-spécifiques. Leurs natures chimiques sont variées, allant de petites molécules volatiles à des stéroïdes ou encore des protéines. Les signaux chimiques utilisés par de nombreuses espèces d'insectes ont été identifiés (www.pherobase.com), principalement les phéromones de Lépidoptères (Pherolist : www.nysaes.cornell.edu/pheronet/). En effet, les insectes communiquent principalement entre eux grâce à des signaux chimiques, contrairement aux vertébrés, et plus particulièrement les mammifères, qui utilisent d'autres modalités sensorielles, telles que la vision, l'ouïe ou le toucher. Ainsi, peu de signaux chimiques sont connus chez les mammifères : la phéromone sexuelle de l'éléphant (Rasmussen *et al.*, 1982, 1997), la phéromone maternelle de lapin (Schaal *et al.*, 2003) et la phéromone sexuelle de porc (Dorries *et al.*, 1995). Chez les rongeurs, des signaux protéiques sont impliqués dans la reconnaissance interindividuelle (MUP pour Major Urinary Protein chez la souris, Hurst *et al.*, 2001) et l'attraction des femelles par les mâles est due à la Darcin, une petite protéine apparentée aux MUP (Roberts *et al.*, 2010). Chez le hamster, l'aphrodisine, de nature protéique, est impliquée dans le comportement pré-copulatoire du mâle (Cavaggioni & Mucignat-Caretta, 2000). Il existe une controverse sur la définition de phéromone chez les mammifères. Si les phéromones impliquées dans le comportement sexuel sont reconnues comme telles, les signaux chimiques utilisés pour distinguer les congénères, les signaux de maintien de la hiérarchie, et en général les signaux "sociaux" présentent une importante variabilité. C'est le cas par exemple des signaux associés à l'œstrus chez les bovins qui ont été étudiés dans notre laboratoire (Le Danvic, 2009). Ces signaux sont désignés par le terme "signature odours" par les auteurs anglais (Wyatt, 2009) que l'on peut traduire par "odeur sociale".

L'objectif de l'équipe "glycobiologie de l'Olfaction" est de comprendre les mécanismes moléculaires du codage des signaux chimiques intra-spécifiques chez les mammifères d'élevage. Dans ce cadre, mes travaux de thèse se sont focalisés sur les relations

structure-fonction des protéines de liaison avec leurs ligands spécifiques chez le porc *Sus scrofa*.

I. La communication chimique chez le porc, *Sus scrofa*

I. a. Données économiques

La production mondiale de porcs était en 2003 d'environ 955,5 millions d'animaux, produits en Asie (577 millions), en Europe (199 millions), en Amérique du Nord (93 millions), en Amérique du Sud (59 millions) et en Afrique-Océanie (Australie principalement, 27 millions). La production mondiale est en progression constante et l'on estime à 15% son accroissement à l'échéance de 2012. La Chine produit à elle seule presque la moitié du total mondial. Donc, bien que plusieurs religions interdisent la consommation de porc, sa production reste d'un intérêt économique crucial. Mais le porc n'est pas seulement élevé pour sa viande. Sa constitution anatomique et biologique proche de l'homme et sa facilité d'élevage, ont fait que le cochon est utilisé en recherche médicale et dans des applications thérapeutiques : chirurgie cardiaque, production d'insuline, héparine contre l'hypertension, peau de porc pour le traitement des grands brûlés.

La plupart des porcs est élevée dans des conditions intensives, pour lesquelles des règles concernant le bien-être animal ont été établies par la communauté européenne. Il est crucial aujourd'hui d'améliorer les conditions d'élevage, et une des voies les plus intéressantes est celle qui consiste à exploiter le sens de l'olfaction, qui est très développé chez le porc. Il est en effet utilisé depuis des siècles pour rechercher les truffes, qui contiennent une substance proche d'un des composants de la phéromone sexuelle et que le porc détecte de façon très efficace. Les modalités de la communication chimique chez le porc sont mieux connues que chez la plupart des espèces, tant d'un point de vue fondamental que pour les applications au niveau des systèmes d'élevage.

I. b. Les signaux chimiques et leur rôle dans le comportement

La phéromone sexuelle du porc est une des premières à avoir été identifiée chez les mammifères. Elle est composée de deux stéroïdes (Figure 1), l'androsténol (5α -Androst-16-en-3 α -ol) et l'androsténone (5α -Androst-16-en-3-one).

Cette phéromone se concentre dans la salive et constitue l'odeur caractéristique du mâle. L'odeur de la salive est attractive pour les femelles en œstrus (Melrose *et al.*, 1971,

Reed *et al.*, 1974) et sa détection facilite l'acceptation du mâle par les femelles (Signoret, 1970). Par ailleurs, la perception de l'urine d'un mâle dominant par des porcs pré-pubères induit un comportement de soumission (McGlone, 1985). La détection de l'androsténone seule par les porcelets pré-pubères réduit les comportements antagonistes (McGlone & Morrow, 1988) et améliore la croissance (McGlone *et al.*, 1986). La phéromone de porc est un exemple du caractère ubiquiste des médiateurs chimiques, puisque sa perception déclenche des comportements différents chez des animaux de stades physiologiques différents (pubères et pré-pubères). Lorsqu'elle est perçue par les femelles adultes, il s'agit d'une phéromone sexuelle, tandis que lorsqu'elle est perçue par des porcelets (mâles ou femelles), elle induit la soumission et entre dans la catégorie des "odeurs sociales" (Wyatt, 2009).

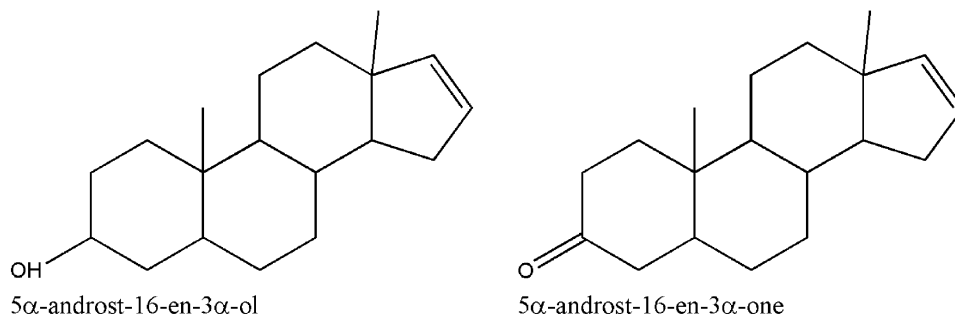


Figure 1: Structure chimique des composants de la phéromone sexuelle de porc

D'autres "odeurs sociales" ont été identifiées chez le porc. Il s'agit d'une sécrétion mammaire de la truie allaitante, dénommée substance apaisante porcine (SAP, Pageat, 2001) dont l'analogue synthétique est commercialisé (Suilence[®], CEVA). L'application de la SAP sur la mangeoire ou sur la truffe des porcelets au moment du sevrage, a des effets comportementaux visibles et significatifs. Les animaux passent plus de temps à la mangeoire, et sont moins engagés dans des comportements antagonistes. Pageat & Tessier (1998) montrent que le nombre de morsures diminue de 70 % quand on applique la SAP. De plus, Suilence[®] a des effets positifs sur le gain de poids des porcelets et sur l'efficacité d'utilisation de la nourriture (McGlone & Anderson, 2002). Le gain de poids quotidien d'un porcelet est accru de 14 % sans consommation excessive de nourriture (Pageat & Tessier, 1998). Cette substance semble avoir de nombreux autres avantages zootechniques car elle pourrait permettre d'anticiper les situations de stress infligées aux animaux lors des transports ou servir d'alternative en médecine vétérinaire en tant qu'anesthésiant (Madec *et al.*, 2002). Des effets sur l'amélioration de la fertilité des truies ont également été constatés. Cette substance à effet apaisant est composée de 6 acides gras (Figure 2): l'acide caprique (C10:0), l'acide

laurique (C12:0), l'acide linoléique (C18:2), l'acide myristique (C14:0), l'acide oléique (C18:1) et l'acide palmitique (C16:0).

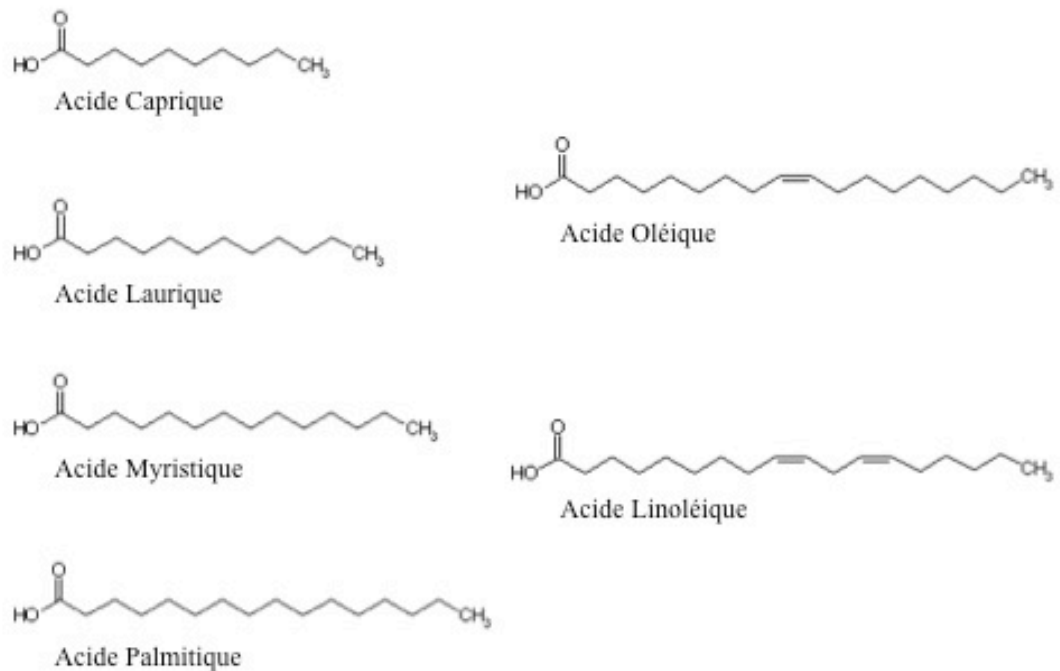


Figure 2: Structure chimique des composants de la substance apaisante porcine (SAP)

La disponibilité des composants de la SAP et des composés de la phéromone sexuelle est une opportunité pour comprendre les processus du codage périphérique de composés spécifiques dans cette espèce. En effet, les mécanismes moléculaires impliqués dans la détection précoce des odeurs, phéromonales ou non, sont encore peu élucidés chez les Mammifères. Plusieurs acteurs de ces évènements péri-récepteurs ont déjà été identifiés : des enzymes dégradant les odeurs, des récepteurs olfactifs et des protéines olfactives liant les odeurs. Pourtant, le manque de ligands odorants signifiants pour l'animal (spécifiques) a limité l'étude des interactions cinétiques entre ces molécules. La connaissance des molécules spécifiques (phéromone et odeur sociale) est donc une opportunité pour étudier ces mécanismes de façon pertinente.

I. c. Le système olfactif

Chez les mammifères, l'organe cible des odeurs et des phéromones est le système olfactif. Il est en réalité constitué de deux systèmes, le système olfactif principal (SOP) et le système olfactif accessoire ou organe voméronasal (OVN).

I. c. 1. Le système olfactif principal

Chez le porc, le SOP est situé dans la cavité nasale et est constitué de la muqueuse respiratoire (MR) et de la muqueuse olfactive (MO) située à l'arrière de la cavité (Figure 3).

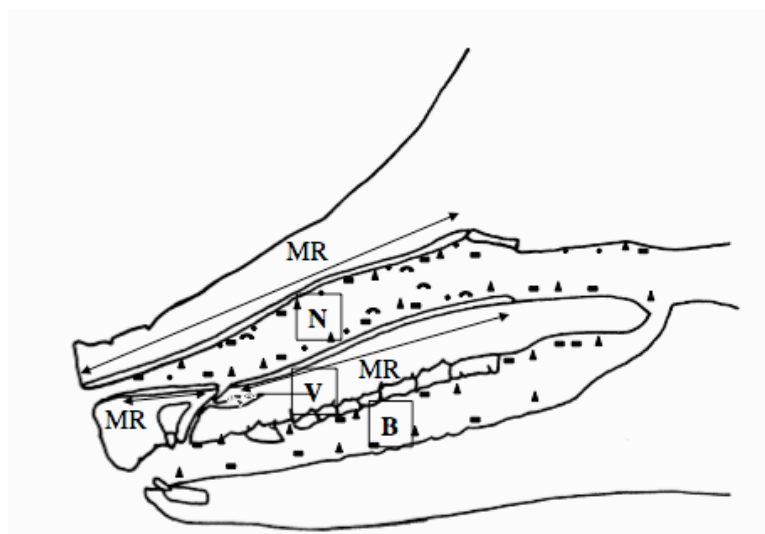


Figure 3: Coupe sagittale d'une tête de porc. MR, muqueuse respiratoire; V, organe voméronasal; N, cavité nasale; B, cavité buccale. D'après Guiraudie, 2003.

Toute la cavité nasale est recouverte de mucus sécrété par de multiples glandes, comme les glandes de Bowman. Ce mucus est un milieu aqueux composé de deux phases : l'une très liquide contenant essentiellement de l'eau, constituant la couche superficielle et l'autre, visqueuse, constituant la couche inférieure, en contact avec la muqueuse (Getchell *et al.*, 1984). Le mucus a plusieurs fonctions. Il semble impliqué dans le processus de défense immunitaire puisqu'il contient des immunoglobulines (Getchell & Getchell, 1991). Il contient aussi des protéines de la famille des cytochromes P450, probablement impliquées dans la détoxification (Ding *et al.*, 1986 ; Nef *et al.*, 1989 ; Zupko *et al.*, 1991). Servant d'interface entre l'épithélium olfactif et la lumière nasale, le mucus est le lieu où se déroulent les événements péri-récepteurs de la transduction olfactive. Il capte, concentre les molécules odorantes et participe à leur élimination (Getchell *et al.*, 1984). Le mucus contient des protéines solubles liant les odeurs à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Ces protéines olfactives (olfactory binding protein) prennent en charge les odeurs et les transportent au travers de la barrière hydrophile formée par le mucus (Bignetti *et al.*, 1985 ; Pevsner *et al.*, 1986 ; Pevsner *et al.*, 1988 ; Dal Monte *et al.*, 1991).

I. c. 2. Le système olfactif accessoire ou organe voméronasal

L'organe voméronasal (OVN ou organe de Jacobson) se situe au-dessus du palais (Figure 4). Il est relié à la cavité buccale par le canal incisif et à la cavité nasale par le canal nasopalatin (Keverne, 1999; Figure 3). C'est un organe pair de structure tubulaire divisé par le septum nasal. Chacune des deux parties a une forme de croissant renfermant un lumen (Døving & Trotier, 1998). De plus, chacune de ces parties est enfermée dans une capsule cartilagineuse qui la sépare de l'épithélium nasal. L'OVN est bordé de deux types d'épithélium : l'un sensoriel, contenant les neurones olfactifs, et l'autre abritant des cellules sécrétrices de protéines (Døving & Trotier, 1998). La similarité anatomique avec le SOP indique à elle seule que l'OVN est impliqué lui aussi dans la perception de messages odorants. Le lumen est rempli de mucus, mais ses propriétés physico-chimiques sont encore peu connues. Ce mucus contient également des protéines de la famille des cytochromes P450 et des enzymes métabolisant les stéroïdes (Gu *et al.*, 1999), indiquant un rôle proche de celui du mucus olfactif dans la détoxification. Ainsi le mucus de l'OVN semble posséder les mêmes propriétés que celui de la cavité nasale, y compris des fonctions similaires dans les événements périphériques de la détection des odeurs.

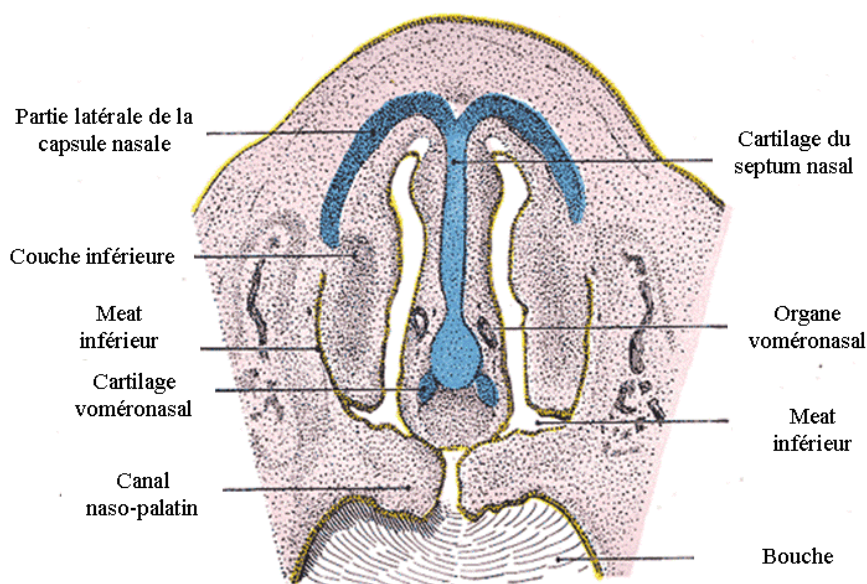


Figure 4: Schéma représentant l'organe voméronasal de mammifères (d'après Guiraudie, 2003)

I. c. 3. Les récepteurs olfactifs

Chacun des deux systèmes exprime des récepteurs particuliers. En effet, en 1991, Buck & Axel isolent des récepteurs olfactifs (RO) constituant une famille d'environ 1000 gènes codant chacun pour une protéine à sept domaines transmembranaires. Chaque neurone exprime un gène unique permettant son activation par une odeur particulière et il se projette dans une région unique du bulbe olfactif principal, appelée glomérule (Dulac, 1997). La recherche de séquences homologues dans l'OVN s'est révélée infructueuse. De même, l'ensemble des gènes exprimés dans le système principal, impliqués dans la transduction intracellulaire des signaux olfactifs (protéine G, adénylcyclase, canal ionique) sont restés indécélables dans l'OVN. Grâce à l'utilisation de banques soustractives, une autre famille de gènes codant des récepteurs a été caractérisée dans l'OVN. Il s'agit d'une famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires (« Vomeronasal Receptors » : VR), sans homologie avec les récepteurs de l'épithélium olfactif (Dulac & Axel, 1995). En fait, différents VR sont exprimés par différents neurones dans l'OVN : les V1R et les V2R (Matsunami & Buck, 1997). Les V1R sont associés à des protéines $G_{\alpha_{i2}}$ tandis que les V2R sont associés à des protéines G_{α_0} (Ryba & Tirindelli, 1997 ; Herrada & Dulac, 1997 ; Matsuoka *et al.*, 2001). Contrairement aux V1R et aux RO, les V2R possèdent une large boucle extracellulaire qui pourrait contribuer à la liaison avec le ligand odorant ou une protéine (Matsunami & Buck, 1997 ; Tirindelli *et al.*, 1998). Les V1R sont stimulés par des molécules odorantes de petit poids moléculaire, alors que les V2R répondent à des signaux de nature protéique (α_{2u} -globulin) (Krieger *et al.*, 1999). Il faut souligner que toutes les informations concernant les récepteurs olfactifs ont été obtenues chez les rongeurs. Ceux du porc ne sont pas connus, bien que le génome soit séquencé, mais pas encore annoté.

L'implication respective des deux systèmes olfactifs dans la détection des odeurs et des phéromones reste peu claire. Les premiers travaux ont montré que les odeurs seraient détectées seulement par le SOP (Mombaerts, 1999), alors que les phéromones seraient détectées via l'OVN (Holy *et al.*, 2000 ; Buck, 2000 ; Leinders-Zufall *et al.*, 2000). Il est maintenant admis que la détection de phéromones peut se faire par le SOP et qu'inversement, des odeurs peuvent stimuler les neurones de l'OVN.

I. c. 4. La transduction des signaux olfactifs

La transduction olfactive consiste à transformer un signal chimique (odeur ou phéromone) en signal électrique. L'activation du récepteur olfactif par son ligand entraîne l'ouverture de canaux ioniques ayant pour effet une dépolarisation de la membrane et la

génération d'un potentiel d'action. Il s'ensuit une succession d'événements intracellulaires, dite cascade de transduction, médiée chez les vertébrés selon deux voies, celle impliquant la phospholipase C et celle impliquant l'adénylate cyclase (Figure 5).

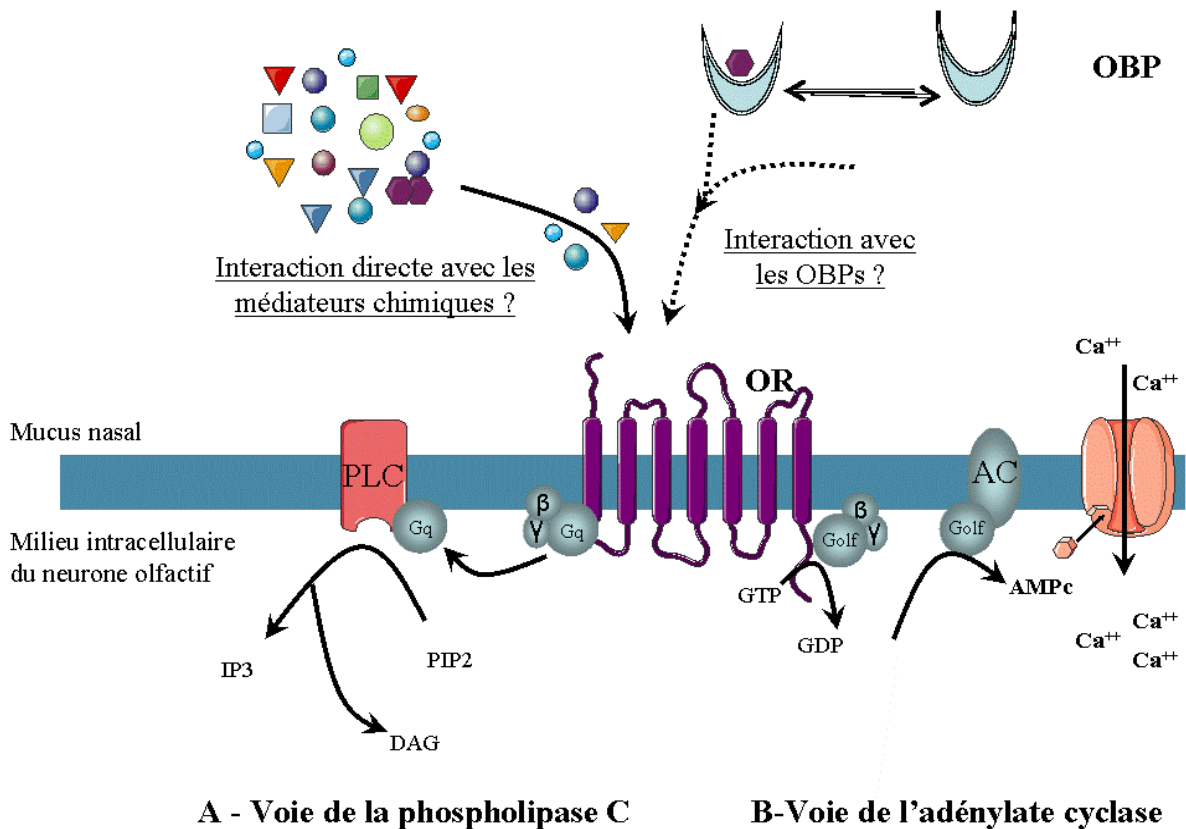


Figure 5: Schéma des événements extracellulaires et intracellulaires impliqués dans la transduction olfactive. D'après Tcatchoff, 2006.

Ces événements intracellulaires sont bien connus, contrairement à la nature des ligands des récepteurs olfactifs. En effet, les signaux chimiques sont en général hydrophobes et volatils, et ne peuvent donc pénétrer le mucus olfactif sans l'aide de protéines de liaison, appelées Olfactory-Binding Proteins (OBP). Ces protéines sont sécrétées par les glandes de Bowman de l'épithélium olfactif ou par l'épithélium de l'OVN. Elles sont libérées dans le mucus à forte concentration et selon une première hypothèse, solubilisent et transportent de façon passive les signaux chimiques (Tegoni *et al.*, 2000). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les récepteurs olfactifs peuvent être stimulés *in vitro* par des molécules odorantes, en absence d'OBP (Kajiya *et al.*, 2001). Cependant, une deuxième hypothèse suggère que ces protéines pourraient avoir un rôle actif dans le tri des signaux chimiques, en se liant de façon plus spécifique à des molécules de natures chimiques différentes. Cette interaction spécifique a été démontrée pour une sous-classe d'OBP, les PBP (pour Pheromone Binding Protein). Ces

protéines sont sécrétées dans le mucus nasal, et aussi dans les fluides biologiques impliqués dans la communication chimique tels que la salive, l'urine et les larmes. La perception de PBP contenant des ligands phéromonaux déclenche des réponses comportementales adaptées:

- les MUP de souris (Major Urinary Protein, Finlayson *et al.*, 1969) sont synthétisées dans le foie et excrétées dans l'urine où elles vont se lier avec des composés phéromonaux (Novotny *et al.*, 1999). Les composés phéromonaux de la MUP présents dans l'urine sont la dihydrothiazoline et la brévicomine (Bacchini *et al.*, 1992). La MUP présente dans les urines mâles est également une phéromone capable d'accélérer la puberté chez les femelles (Cavaggioni & Mucignat-Caretta, 2000).

- L'Aphrodisine, présente dans la décharge vaginale des femelles de hamster stimule le comportement de monte des mâles (Singer *et al.*, 1986 ; Singer *et al.*, 1987 ; Singer & Macrides, 1990).

- La SAL (Salivary Lipocaline) est sécrétée par les glandes sous-maxillaires du verrat et ses ligands andogènes sont l'androsténol et l'androsténone, les composés de la phéromone sexuelle du verrat (Marchese *et al.*, 1998 ; Loëbel *et al.*, 2000 ; Spinelli *et al.*, 2002).

Par contre, les OBPs (Odorant-Binding Protein, *stricto sensu*) sont considérées comme des transporteurs passifs de molécules odorantes, principalement du fait de leur manque de spécificité de liaison. Les OBPs ont été largement étudiées chez différentes espèces (pour revue, Tegoni *et al.*, 2000). La première à avoir été découverte est l'OBP bovine (Pelosi *et al.*, 1982), en recherchant un « récepteur » à un ligand odorant, la 2-isobutyl-3-[³H]méthoxy-pyrazine (IBMP, odeur de poivron vert) dans le mucus olfactif bovin. Le test de liaison avec l'IBMP a d'ailleurs été utilisé pour caractériser d'autres OBP, en absence d'autres critères. En effet, l'identité de séquence entre OBP d'espèces différentes avoisine les 30%, ce qui a pour conséquence une absence de réaction croisée entre les anticorps et les protéines. De plus, la faible identité protéique reflète une forte divergence des séquences nucléotidiques codantes, interdisant l'utilisation d'amorces pour le clonage par homologie dans les autres espèces. La liaison avec les molécules odorantes est donc la principale caractéristique des OBP. Cette liaison semble peu spécifique, à la fois car la constante d'affinité mesurée est de l'ordre du micromolaire et car les OBPs se lient indifféremment avec des molécules de structures chimiques très variées. Ainsi, les "bons" ligands pour l'OBP bovine ($0,1 < K_d < 1 \mu M$) sont l'IBMP, des terpènes, et les "mauvais" ligands (K_d de $100 \mu M$) le benzaldéhyde, la quinoline, mais aussi d'autres terpènes (Pelosi & Tirindelli, 1989; Pevsner *et al.*, 1990). Il y a cependant une certaine contradiction entre le fait que l'OBP bovine soit capable de

discriminer deux terpènes très proches, le thymol et le p-cresol (Pelosi, 1994), respectivement "bon" et "mauvais" ligands, et l'interprétation qui en a été faite durant deux décennies selon laquelle l'OBP est un transporteur passif. Par ailleurs, également en contradiction avec ce rôle supposé, la caractérisation de plusieurs isoformes d'OBP au sein d'une même espèce (Pelosi, 1994), en particulier le porc-épic, chez lequel pas moins de 8 isoformes ont été purifiées, mais dont les différences n'ont pas été étudiées (Felicioli *et al.*, 1993). Les auteurs ont suggéré qu'il pouvait s'agir de mutations dans la séquence primaire ou de modifications post-traductionnelles (Pelosi, 1994).

II. Les protéines de liaison chez le porc

Chez les vertébrés, les protéines liant les odeurs appartiennent à la superfamille des lipocalines (Grzyb *et al.*, 2006).

II. a. Les lipocalines

Cette famille est largement représentée chez les plantes, les animaux et les bactéries. La caractéristique commune à toutes les lipocalines est leur propriété de lier des ligands lipophiles. Elles ont des poids moléculaires variés, mais le domaine déterminant les propriétés spécifiques est de 18-20 kDa, il contient un motif GXW près de l'extrémité N-terminale. La structure en calice est constituée d'un tonneau (ou feuillet) β , lui-même formé de 8 chaînes antiparallèles reliées par des boucles. Une ou deux hélices α peuvent y être connectées. La structure tertiaire du tonneau beta est stabilisée par la formation d'un à trois ponts disulfures. La cavité au sein du tonneau β est tapissée d'acides aminés hydrophobes et sa taille est variable, ce qui représente une adaptation majeure de ces protéines à leur ligand et donc à leur fonction. En dépit d'une forte conservation de la structure secondaire et de la structure tertiaire, la structure primaire est fortement variable et l'identité en acides aminés entre les lipocalines n'excède jamais 30% (Flower, 1996). Deux sous-familles ont été définies en fonction de la conservation de certains domaines, les lipocalines "kernel" et les lipocalines "outlier". Dans la première, on trouve la retinol-binding protein (RBP) qui transporte le rétinol sécrété dans le foie vers d'autres organes (Zanotti *et al.*, 1993), la β -lactoglobuline qui séquestre les acides gras du lait et facilite la digestion (Perez *et al.*, 1992), et l'apolipoprotéine D qui est impliquée dans les dysfonctionnements des capacités cognitives chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer (Thomas *et al.*, 2003). Dans le groupe des "outlier" lipocalines, se trouvent d'autres apolipoprotéines, des enzymes végétales importantes pour le

cycle xanthophylle, les histamines-binding protein, la crustacyanine et les odorant-binding protein.

La particularité des lipocalines est de former des dimères, voire des oligomères qui s'agrègent, permettant d'occuper un espace donné avec le plus de molécules possibles, caractéristique des protéines sécrétées par les glandes exocrines. L'agrégation intervient à pH 5-6 et à forte concentration de calcium, et s'avère dépendante du point isoélectrique de la protéine, qui doit être bas (Mans & Neitz, 2004). De plus, il a été démontré que l'agrégation est influencée par la présence du ligand dans la protéine. L'exemple le plus intéressant est celui de la phéromone d'éléphant, le Z-7-dodécényl acétate, qui se lie à l'albumine dans l'urine d'éléphante à pH 8 (Rasmussen, 2001). Par contre, après transport dans la trompe par l'OBP d'éléphant, le pH de 5.5 de la muqueuse olfactive du mâle est favorable à la dissociation du complexe et à la libération de la phéromone (Lazar *et al.*, 2002). La dissociation du ligand à faible pH a également été observée pour la "Tear Lipocaline" humaine (Wojtnar *et al.*, 2001), protéine homologue à la VEG porcine, ainsi que pour la beta-lactoglobuline (Ragona *et al.*, 1997).

Les lipocalines partagent une même structure génique, avec le même nombre d'introns (4-6) et d'exons (7-8). Les lipocalines qui ont émergé le plus récemment contiennent un plus grand nombre d'introns que les 4 des gènes d'origine plus ancienne. L'arrangement introns/exons est conservé entre les gènes orthologues et paralogues (Sanchez *et al.*, 2003). De plus, l'organisation des gènes codant les lipocalines se fait en "clusters" sur les chromosomes, créés par duplication de gènes et divergence fonctionnelle au cours de l'évolution.

Enfin, plusieurs lipocalines sont associées avec des membranes et jouent un rôle dans la transduction du signal. Ceci peut intervenir selon deux mécanismes : le premier, direct, implique l'interaction entre d'une part, la lipocaline et son ligand et d'autre part un récepteur membranaire impliquant la voie AMPc. Le deuxième serait indirect et médié par les lipocalines (Yang *et al.*, 2002; Wojtnar *et al.*, 2001). Par exemple, l'AGP (alpha-1-acid glycoprotein) subit des changements conformationnels induits par son interaction avec la membrane des cellules (Nishi *et al.*, 2004). L'AGP est une "outlier lipocaline" hautement glycosylée, qui se lie avec la progestérone et d'autres stéroïdes. Lors de sa liaison avec la progestérone, la protéine subit un changement de conformation des hélices alpha en tonneau beta (Kopecki *et al.*, 2003). Le rôle des chaînes glycanes serait d'orienter l'AGP vers la phase lipidique de la membrane (Nishi *et al.*, 2004). Certaines lipocalines subissent une internalisation après interaction avec la membrane, c'est le cas de la NGAL murine,

internalisée dans la paroi de l'épididyme (Elangovan *et al.*, 2004). Ces derniers exemples montrent que les lipocalines peuvent interagir avec les membranes et être impliquées dans la transduction, ce qui suggère que les OBP, une fois chargées de leur ligand pourraient activer les récepteurs membranaires des neurones olfactifs.

II. b. Structure, localisation et sites d'expression des protéines de liaison porcines

Pour des raisons historiques, la nomenclature des protéines de liaison est très confuse. En effet, sont dénommées OBP toutes les protéines de liaison (PBP et OBP *stricto sensu*) et les OBP *stricto sensu*. Dans la suite de ce mémoire, le terme OBP confèrera à l'OBP porcine *stricto sensu*.

Chez le porc, trois protéines de liaison ont été identifiées et caractérisées : L'OBP, la SAL (salivary lipocalin) et la VEG (Von Ebner's Gland Protein). Les trois protéines sont sécrétées dans les mucus de l'aire nasale et de l'organe voméronasal (Figure 3) par les glandes de Bowman.

II. b. 1. L'OBP porcine

L'OBP porcine (OBPp) a été purifiée à partir d'échantillon d'épithélium nasal de porc adulte (Dal Monte *et al.*, 1991) grâce à sa propriété de se lier avec l'IBMP, avec une meilleure affinité ($K_d=0.3 \mu\text{M}$) d'ailleurs que l'OBP bovine ($K_d=3.3 \mu\text{M}$, Vincent *et al.*, 2004). La protéine, purifiée par chromatographie en échange d'anions, est de loin la plus abondante dans le mucus nasal, même si d'autres formes ont été également observées dès l'origine, mais pas caractérisées (Paolini *et al.*, 1998). L'OBP est composée d'une chaîne polypeptidique de 157 acides aminés dont la séquence a été obtenue par séquençage N-terminal (Paolini *et al.*, 1998; numéro d'accèsion SwissProt P81245), alors que la traduction du cDNA obtenu par RT-PCR (MR et OVN d'animal pré-pubère) indique la présence d'une lysine C-terminale additionnelle (Guiraudie *et al.*, 2003; Numéro d'accèsion GenBank AF436848). Le cDNA contient une séquence signal en position 3', indiquant (et confirmant) que l'OBP est synthétisée dans le reticulum endoplasmique et sécrétée à l'extérieur des cellules de la glande de Bowman (Figure 6). La masse moléculaire est donc de 17 689 Da ou de 17 835 Da respectivement ($pI=4.23$). Ces deux formes d'OBP peuvent correspondre à des variants dépendant du stade physiologique (adulte, pré-pubère; Guiraudie *et al.*, 2003). La séquence contient le motif GXW des lipocalines et deux cystéines engagées dans un pont disulfure (Cys63-Cys155, Paolini *et al.*, 1998). La glutamine en position 1 est sous forme de pyroglutamate (PYRR:1) dans la forme majoritaire, mais on peut retrouver des peptides dont la glutamine est libre.

L'identité avec d'autres OBP ou PBP est de 18% à 42% pour la plus similaire, l'OBP bovine (Tegoni *et al.*, 1996). L'OBP a été initialement identifiée dans l'aire nasale (Dal Monte *et al.*, 1991; Paolini *et al.*, 1998; Scaloni *et al.*, 2001), puis dans la muqueuse respiratoire et l'organe voméronasal, par RT-PCR et immunodétection (Guiraudie *et al.*, 2003). Jusqu'à notre étude, aucune modification post-traductionnelle n'a été décrite pour l'OBP porcine.

```

atgaagagtctgctgctgagtcctggctccttggctcctggttggctgcccaggaacctcaacct
M K S L L L S L V L G L V C A Q E P Q P
gaacaagatccctttgagctttcaggaaaatggataaccagctacataggctctagtgac
E Q D P F E L S G K W I T S Y I G S S D
ctggagaagattggagaaaatgcacccttccagggttttcatgcgtagcattgaatttgat
L E K I G E N A P F Q V F M R S I E F D
gacaaagagagcaaagtatacttgaacttttttagcaaggaaaatggaatctgtgaagaa
D K E S K V Y L N F F S K E N G I C E E
ttttcgctgatcggaaccaacaagaaggcaatacttacgatgttaactacgcaggtaac
F S L I G T K Q E G N T Y D V N Y A G N
aacaaatttgtagtttagttatgcgtccgaaactgccctgataatctctaacaatcaatgtg
N K F V V S Y A S E T A L I I S N I N V
gatgaagaaggcgacaaaaccataatgacgggactggttgggcaaaggaactgacattgaa
D E E G D K T I M T G L L G K G T D I E
gaccaagatttgagaagtttaagaggtgacaagagagaacgggattccagaagaaaat
D Q D L E K F K E V T R E N G I P E E N
attgtgaacatcatcgaaagagatgactgtcctgccaagtga
I V N I I E R D D C P A K -

```

Figure 6: Séquences nucléotidique et protéique de l'OBP.
La séquence du peptide signal est soulignée.

La structure tridimensionnelle a été élucidée par cristallographie rayons X (Figure 7), à partir de la forme majoritaire de la protéine purifiée (Résolution de 2.25 Å, Spinelli *et al.*, 1998). Cette lipocaline est un monomère dont la cavité hydrophobe est dépourvue de ligand endogène naturel, au contraire de l'OBP bovine, dont le ligand est l'1-octen-3-ol (Ramoni *et al.*, 2001). La cristallisation de cette protéine permet d'observer deux cristaux d'OBP dont les segment N-terminaux ne sont pas visibles car ces extrémités sont supposées flexibles (Spinelli *et al.*, 1998 ; Vincent *et al.*, 2000). L'OBPp possède une glycine en position 121 qui empêcherait toute dimérisation de la protéine (Spinelli *et al.*, 1998). L'OBP est constituée de 9 feuillets β et d'une seule hélice α : le β 1 va de Ile17 à Ser23, β 2 de Val38 à Asp45, β 3 de Lys50 à Glu59, β 4 de Ile62 à Lys73, β 5 de Tyr77 à Asn81, β 6 de N84 à Ala93, β 7 d'Ala97 à Val106, β 8 de Lys111 à Gly119 et β 9 de Ile146 à Asn148 et l'hélice α va de Asp126 à

Glu138 (Spinelli *et al.*, 1998 ; Perduca *et al.*, 2001). Le pont disulfure Cys 63-Cys 155 relie l'extrémité C-terminale au feuillet β 4.

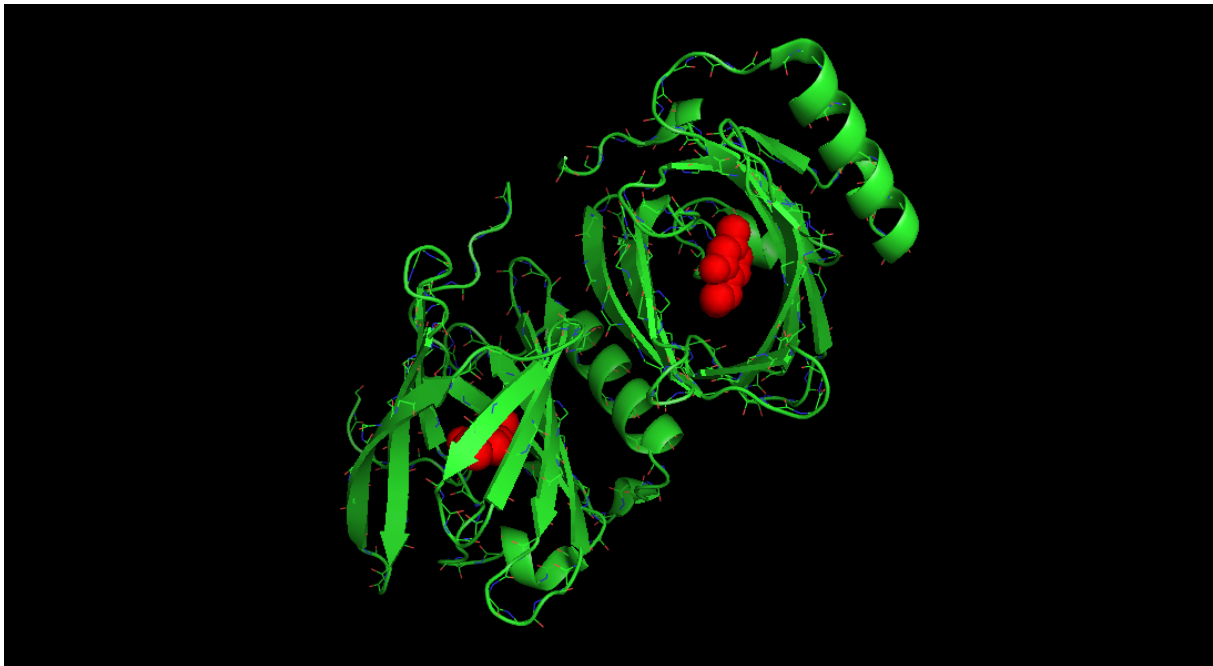


Figure 7: Structure tridimensionnelle de l'OBP avec le ligand co-cristallisé, l'undécanal. Image obtenue avec le fichier PDB 1E02 et le logiciel MacPymTM.

Dans sa séquence primaire, l'OBP ne présente qu'un seul tryptophane en position 16, qui, dans la structure tridimensionnelle, se situe entre le fond de la cavité et l'extérieur de la protéine. Il n'est donc pas en contact avec les molécules odorantes qui se fixent dans la cavité hydrophobe ou avec l'environnement de la protéine, ce qui a des conséquences lors des études par spectroscopie de fluorescence (voir paragraphe II. c). De plus, la structure tridimensionnelle de l'OBP révèle une grande stabilité de la protéine. En effet, la dénaturation de l'OBP nécessite l'action de chlorure de guanidine 4M pendant 24h et ce processus est réversible en diluant le chlorure de guanidine (Parisi *et al.*, 2003). C'est pourquoi l'OBP a été récemment étudiée pour sa capacité à résister à de hautes pressions ou des explosions (Staiano *et al.*, 2007a, 2007b; Stepanenko *et al.*, 2008).

II. b. 2. La SAL (Salivary Lipocaline)

La SAL est sécrétée dans la salive en grandes quantités par les glandes sous-maxillaires du ver rat. Elle est considérée comme une PBP, ses ligands naturels étant les stéroïdes composants de la phéromone sexuelle, l'androsténone et l'androsténol (Marchese *et al.*, 1998). La SAL est beaucoup plus exprimée chez le mâle adulte que chez la femelle

(Marchese *et al.*, 1998), ou que chez les porcelets pré-pubères (Guiraudie, 2003), ce qui est cohérent avec son rôle dans la communication sexuelle. La SAL purifiée du mucus nasal de mâle se présente sous la forme de plusieurs isoformes de poids moléculaires plus élevés que la masse moléculaire calculée à partir de la séquence primaire déduite du cDNA (165 acides aminés, 19 916 Da, pI=5.07). Le clonage de la SAL révèle la présence d'une séquence signal (Figure 8) à l'extrémité 3' et 3 mutations (Loëbel *et al.*, 2000) qui n'expliquent pas l'hétérogénéité observée au niveau protéique. La SAL n'est modifiée par des N-glycosylations que sur Asn 53, alors que deux autres sites de N-glycosylation sont prédits sur les Asn 38 et Asn 99. De plus, la SAL exprimée par la bactérie *Escherichia coli* ne porte pas de chaînes glycanes (Loëbel *et al.*, 2000). En plus de ces N-glycosylations, des isoformes de SAL de masses moléculaires différant d'environ 200 Da (20 777, 20 977, 21 182 Da) ont été mises en évidence par spectrométrie de masse électrospray (Marchese *et al.*, 1998). Dans notre laboratoire, des western-blots ont montré que la SAL est immunoréactive aux anticorps RL2 et CTD110.6, suggérant que la SAL pourrait être également modifiée par la O-GlcNac (masse de 203 Da; Nagnan-Le Meillour, communication personnelle). Par contre, les auteurs n'ont pas observé de différences de propriétés de liaison entre les formes native (glycosylée) et recombinante (non glycosylée) vis à vis des ligands testés (androsténone, diméthyl octanone, phényl éthanol et IBMP; Loëbel *et al.*, 2000).

La SAL a également été identifiée dans l'aire nasale de porc (Scaloni *et al.*, 2001) et nommée OBP-III par les auteurs, pour la différencier de la SAL de la salive. L'OBP-III présente les mêmes caractéristiques que la SAL: peptide signal, pont disulfure Cys68-Cys160 (Cys75 et Cys141 sous forme réduite), N-glycosylation complexe sur Asn 53. Ceci rend incompréhensible la nomenclature utilisée, qui se base sur la localisation anatomique et présuppose une fonction différente. Ceci n'a pas été démontré, mais a été suggéré par le fait que l'OBP-III ne contient pas de ligand endogène, contrairement à la SAL (Scaloni *et al.*, 2001; Marchese *et al.*, 1998). En effet, les auteurs suggèrent que la SAL transporterait ses ligands phéromonaux dans l'environnement et que l'OBP-III les délivrerait à leurs récepteurs. La SAL est également exprimée dans l'organe voméronasal (Guiraudie *et al.*, 2003).

atgaagctgctgctcttgctgtgtctggggctgactctagcctcttcccacaaggaagca
M K L L L L L C L G L T L A S S H K E A
ggccaagatggtgtgacaagcaacttcgatgcttcaaagattgccggcgagtggtattcc
G Q D V V T S N F D A S K I A G E W Y S
attcttttggcctcagacgccaaggaaaatatagaagaaaatggtagcatgagagttttt
I L L A S D A K E N I E E N G S M R V F
gtggagcatatccgtgtcttggacaactcttccttagcctttaaatttcagagaaaggta
V E H I R V L D N S S L A F K F Q R K V
aacggagagtgactgacttttatgcggtttgtgacaaagtaggagatggtgtgtataca
N G E C T D F Y A V C D K V G D G V Y T
gttgccactatggagagaacaaatctgcctacttgaagtgaactattctgactatgctc
V A Y Y G E N K F R L L E V N Y S D Y V
attttacacctgtgaatgtcaatggcgacaaaacattccagctgatggagttctacggc
I L H L V N V N G D K T F Q L M E F Y G
cgaaaaccagatgtggagccaaaactcaaggacaagtttggagatggccaacaatat
R K P D V E P K L K D K F V E I C Q Q Y
ggcatcatcaaggaaaacataatcgatctgaccaaattgatcgctgcttccaactccga
G I I K E N I I D L T K I D R C F Q L R
gggagtgaggaggtccaggaggtccagtgctgagtgga
G S G G V Q E S S A E -

Figure 8: Séquences nucléotidique et protéique de la SAL.
La séquence signal est soulignée.

La structure tridimensionnelle de la SAL a été obtenue par cristallographie rayons X (Figure 9) à partir d'une des 2 isoformes purifiées à partir de mucus nasal de porc adulte (Spinelli *et al.*, 2002). La SAL se compose d'un tonneau β constitué de 9 feuillets β et d'une hélice α , proche de l'extrémité C-terminale comme pour toutes les lipocalines. Par contre, la structure montre que la cavité hydrophobe, dépourvue de ligand endogène dans le cristal, est trop petite pour abriter les stéroïdes sexuels. Cependant, des calculs de dynamique moléculaire indiquent que la cavité augmente de volume lors de la liaison avec les stéroïdes, ce qui explique la spécificité de la protéine pour ses ligands (Spinelli *et al.*, 2002).

Enfin, si la SAL est très spécifique du porc (de par ses ligands endogènes), elle présente de fortes homologues avec d'autres PBP de mammifères, en particulier l'aphrodisine de Hamster (Singer & Macrides, 1990), les MUP urinaires (Robertson *et al.*, 1996) et les MUP salivaires (Shaw *et al.*, 1983; Stopkova *et al.*, 2010): homologie de structure et de fonction (liaison avec des composés phéromonaux). Mais les gènes codant ces protéines, sans être des orthologues car situés sur des chromosomes différents, sont des paralogues. Leur structure génique est identique (arrangement introns/exons).



Figure 9: Structure tridimensionnelle de la SAL (MacPyMOL™ à partir du fichier PDB 1GM6) montrant la structure en tonneau β composée des feuilletts β (à gauche) et de l'hélice α (à droite).

II. b. 3. La VEG (Von Ebner's Gland Protein)

Chez le porc, la VEG est synthétisée par les glandes de Von Ebner de la langue et sécrétée dans la salive. Elle est aussi sécrétée dans les larmes par les glandes lacrymales (Garibotti *et al.*, 1995). Sa forte concentration dans la salive a suggéré aux auteurs un rôle dans la transduction des stimuli gustatifs. Mais les tests de liaison avec des molécules sapides, le rétinol ou des molécules odorantes se sont révélés négatifs (Garibotti *et al.*, 1995; Loëbel *et al.*, 2000; Burova *et al.*, 2000). L'homologue humaine de la VEG, la "Tear Lipocaline" (TL) contient des ligands naturels endogènes : des acides gras, du cholestérol, des phospholipides et des glycolipides (Glasgow *et al.*, 1995), avec une affinité plus importante pour les acides gras les moins solubles (Redl, 2000). Les ligands endogènes de la VEG y sont liés très fortement, car les premières tentatives d'extraction ont été infructueuses (Garibotti *et al.*, 1995; Burova *et al.*, 2000). Récemment, les ligands naturels de la VEG porcine ont été identifiés dans notre laboratoire (Le Danvic *et al.*, 2009) : il s'agit de la testostérone et de la dihydrotestostérone pour l'isoforme modifiée par la *O*-GlcNac (VEG 1) et d'acides gras pour l'isoforme non modifiée (VEG 2). Le test de liaison démontre que ce stéroïde n'est lié que par la VEG 1 et n'est lié ni par l'OBP, ni par la SAL dans les extraits de tissus olfactifs (Le Danvic

et al., 2009). Il s'agit donc de la VEG présente dans l'aire nasale, appelée OBP-II par les mêmes auteurs que précédemment (Scaloni *et al.*, 2001), pour la différencier de la VEG présente dans la salive ou dans les larmes. En tout état de cause, il semble que la VEG de l'aire nasale devrait être classifiée dans les PBP, mais l'effet comportemental (phéromonal?) de la testostérone reste à démontrer.

La séquence nucléotidique de la VEG, amplifiée par RT-PCR à partir de la MR et de l'OVN de porc pré-pubère (Guiraudie *et al.*, 2003; numéro d'accession GenBank AY177149) contient une séquence signal et code une protéine mature de 157 acides aminés (Figure 10) pour une masse moléculaire de 17 444 Da (pI=4.89). Deux variants de séquence primaire ont été identifiés, l'un correspondant à la VEG de la salive et de l'OVN et l'autre correspondant à la VEG de la muqueuse respiratoire (substitution Pro141⇒Leu). La glutamine en position 1 peut, comme pour l'OBP, être sous forme de pyroglutamate, on parle alors de séquence bloquée à l'extrémité N-terminale (séquençage d'Edman).

```

atgatgagggctctgctcctggccattggcctcggcctcggttgctgccctgcaggcccag
M M R A L L L A I G L G L V A A L Q A Q
gagttcccggccgtggggcagccgctgcaggatctgctggggagatggtatctgaaggcc
E F P A V G Q P L Q D L L G R W Y L K A
atgacctcggaccggagattcccgggaagaagcccagatcggtgacccccctgattctc
M T S D P E I P G K K P E S V T P L I L
aaggccctggagggggcgacctggaagcccagataacctttctgattgacggtcagtgc
K A L E G G D L E A Q I T F L I D G Q C
caggacgtgacactggtcctaagaaaaccaaccagcccttcacgttcacggcctatgac
Q D V T L V L K K T N Q P F T F T A Y D
ggcaagcgcgtggtgtacatcttaccgtccaaggtgaaggaccactacattctctactgc
G K R V V Y I L P S K V K D H Y I L Y C
gaggggtgagctggacgggcaggaggtccgcatggcgaagctcgtgggaagagaccagag
E G E L D G Q E V R M A K L V G R D P E
aacaaccagaggctttggaggagttcaaggaggtggcaagagccaaagggctaaacctg
N N P E A L E E F K E V A R A K G L N L
gacatcgtcaggccccagcaaagcgaaacctgctctccaggaggggaactag
D I V R P Q Q S E T C S P G G N -

```

Figure 10: Séquences nucléotidique et protéique de la VEG de la muqueuse respiratoire. La séquence du peptide signal est soulignée.

La structure tridimensionnelle de la VEG n'est pas connue, reflétant certainement sa difficulté à cristalliser. Cette protéine est en effet difficile à étudier de par son comportement physico-chimique (Burova *et al.*, 2000), et à exprimer car elle se révèle toxique pour les

cellules. La TL humaine a été cristallisée, et sa structure révèle une cavité hydrophobe particulièrement grande pour une lipocaline, qui s'étend profondément dans le tonneau β , jusqu'à se terminer en deux lobes distincts (Breustedt *et al.*, 2006). Ceci peut expliquer le grand nombre de ligands endogènes extraits de la TL (Glasgow *et al.*, 1995) mais ne donne aucune indication sur sa fonction.

II. b. 4. Comparaison des trois protéines

Si on effectue un alignement des trois séquences (Figure 11, Multalin: Corpet, 1988), on constate que l'OBP et la VEG, bien que partageant moins de 20% d'identité, sont assez comparables en termes de taille (17 835 Da et 17 444 Da respectivement), et de charge (pI de 4,23 et 4,89).

```

      1                                     50
OBP   .....QEPO PEQDPFELSG KWITSYIGSS DLEKIGENAP FQVFMRSIEF
SAL   HKEAGQDVVT SNFDASKIAG EWYSILLASD AKENIEENG MRVFEHIV
VEG   .....QEFPA VGQPLQDLLG RWYLKAMTSD P..EIPGKKP ESVTPLILKA
Consensus .....q#.p. ..qd...l.G .Wy.....Sd ..e.I.en.p ..Vf...i..

      51                                     100
OBP   DDKESKVYLN FFSKENGICE EFSLIGTKQE GNTYDVNYAG NNKFVVSYS
SAL   LDNSSLAF.K FQRKVNGET DFYAVCDKVG DGVYTVAYYG ENKFRLLLEVN
VEG   LEGGDLEA.Q ITFLIDGQCQ DVTLVLKKTN QPFTFTAYDG KRVVYILPSK
Consensus l#..sl.... f..k.#G.C. #f.l!..K.. ...y.vaY.G .nkf..l...

      101                                    150
OBP   ETALIISNIN VDEEGDKTI. MTGLLGKGTD IEDQDLEKFK EVTRENGIPE
SAL   YSDYVILHL. VNVNGDKTFQ LMEFYGRKPD VEPKLDKDFV EICQQYGIK
VEG   VKDHYILYCE GELDGQE.VR MAKLVGRDPE NNPEALEEFK EVARAKGL.N
Consensus ..d..Il... v#.#G#kt.. $..l.Gr.p# .#p..l#kFk E!.r..Gi...

      151                                    177
OBP   ENIVNIIERD DCPAK.....
SAL   ENIIDLTKID RCFQLRGSGG VQESSAE
VEG   PDIVRPQOSE TCSPGGN...
Consensus e#I!.....# .C.....

```

Figure 11: Alignement des séquences protéiques de l'OBP, de la SAL et de la VEG. Multalin version 5.4.1, Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996.

En revanche, la SAL est très différente pour plusieurs raisons: sa séquence N-terminale est plus longue et commence par un H (au lieu de Q) ce qui a pour conséquence que le N-terminal est accessible au séquençage et n'est pas bloqué comme pour la VEG et l'OBP. La SAL est N-glycosylée sur l'Asn 53, substituée par une Lys pour l'OBP et une Gly pour la VEG. D'ailleurs une recherche de prédictions de sites de N-glycosylation (NetNGlyc 1.0 Server via www.expasy.org) est négative pour ces deux protéines. Si elles sont sécrétées par

les mêmes glandes (de Bowman dans le tissu olfactif), ces protéines sont codées par des gènes qui doivent être assez différents. Le génome du porc n'étant pas encore annoté, une recherche bioinformatique de séquences similaires à l'OBP, la SAL et la VEG a été faite avec le logiciel Blast dans Ensembl.org, base de données de séquences assemblées pour le porc, couvrant le génome des chromosomes 1 à 18 et le chromosome X (Sscrofa9, avril 2009). La VEG est située sur le chromosome 6, la SAL sur le chromosome 1 et l'OBP sur le chromosome X en position télomérique (CU914699.7). Les gènes codant les 3 protéines sont composés de 7 exons et 6 introns. La première moitié du premier exon est non codante, ainsi que le septième exon. La structure des gènes n'a pas été étudiée, les promoteurs ne sont pas connus. Cependant, on peut penser que des gènes situés dans des environnements chromosomiques différents ne sont pas régulés de la même façon.

II. c. Propriétés de liaison de l'OBP, de la SAL et de la VEG

Si la structure des trois protéines est différente, les connaissances acquises sur leurs propriétés de liaison indiquent que leurs fonctions sont différentes. La mieux connue est l'OBP, pour laquelle de nombreuses études des relations structure/fonction ont été conduites. Plusieurs tests de liaison ont été utilisés successivement.

II. c. 1. Le test de liaison sur filtre

L'OBP bovine a été initialement caractérisée par sa liaison à l'IBMP, en utilisant un test de liaison sur filtre (Dal Monte *et al.*, 1991). Il nécessite la synthèse de ligand radioactif, l'IBMP tritié, dont la liaison avec la protéine est ensuite déplacée par des ligands "froids". Ce test permet de mesurer l'affinité des protéines pour différents ligands et a conduit à déterminer une classe de "bons" et de "mauvais" ligands pour l'OBP porcine (Pelosi, 1994). Il faut noter que depuis l'origine, la discrimination de l'OBP vis à vis de ligands de structures chimiques différentes a été démontrée, ce qui est en contradiction avec le rôle de transporteur passif attribué ensuite à l'OBP. En moyenne, l'affinité mesurée est de l'ordre du micromolaire, avec des différences de l'ordre d'un facteur 10 à 100, ce qui n'est pas négligeable.

Une variante de ce test consiste à incuber des cellules transformées avec un récepteur olfactif et l'OBP porcine iodinée (^{125}I) en plaque 24 puits. La cinétique de dissociation est suivie en présence d'OBP froide en excès. Ce test a montré que l'OBP porcine native interagit spécifiquement avec le récepteur olfactif humain OR 17-210 (Matarazzo *et al.*, 2002), et qu'il en est de même pour l'OBP recombinante produite par les cellules de la levure *Pichia pastoris* (Guiraudie-Capraz *et al.*, 2005a).

II. c. 2. Le test de liaison en chambre de diffusion de vapeurs

Ce test repose sur la volatilité des molécules et tente de mimer les conditions dans lesquelles les molécules odorantes passent de l'air au milieu aqueux que constitue le mucus. Ce mucus est mimé par une solution de protéine (OBP porcine 2 μ M dans un tampon Tris) placée et équilibrée dans une chambre close. L'IBMP tritié est introduit dans le tampon et après équilibre la radioactivité est comptée. Les expériences de déplacement sont ensuite effectuées en introduisant les molécules odorantes dans l'espace contenant l'air et après trois jours d'incubation, la radioactivité liée aux protéines est comptée. Ce test n'a pas beaucoup été utilisé, mais fournit les mêmes valeurs de constantes d'affinité que le test sur filtre (Vincent *et al.*, 2000).

II. c. 3. Le test de liaison sur gel

Ce test a été mis au point par Vogt & Riddiford (1981) pour caractériser la première PBP d'insecte, celle du papillon de nuit *Anthaerea polyphemus*. Il a l'avantage de pouvoir identifier dans un mélange, la ou les protéines présentant une affinité pour un composé donné. Celui-ci doit être radioactif puisque la révélation se fait par fluorographie (formaldéhyde et acide salicylique). Brièvement, les extraits contenant des protéines olfactives sont incubés avec un composé odorant ou phéromonal tritié, puis séparées par électrophorèse non dénaturante et transférées sur membrane. La membrane est incubée 7 jours avec un film photographique, et c'est le film qui est ensuite révélé. Les protéines qui se lient avec le composé radioactif présentent un marquage qui est comparé avec leur position sur la membrane colorée au rouge Ponceau (Guiraudie *et al.*, 2003). Chez les mammifères, ce test a permis de mettre en évidence des liaisons spécifiques entre OBP, SAL et VEG de muqueuse respiratoire et d'OVN, avec les stéroïdes sexuels et les composants de la SAP (Guiraudie *et al.*, 2003; Le Danvic *et al.*, 2009). Il a également permis de mettre en évidence la présence d'OBP dans les fluides maternels de la truie, le liquide amniotique, le colostrum et le lait, qui se lie aux composants de la SAP (Guiraudie-Capraz *et al.*, 2005b). Ce travail a démontré qu'il existe une continuité à la fois olfactive et protéique entre les liquides maternels et le fœtus (Guiraudie-Capraz *et al.*, 2005b).

Cependant, ce test est qualitatif et ne permet pas de quantifier l'affinité entre les protéines et les ligands. Il nécessite également de disposer des analogues radioactifs des composés odorants ou phéromonaux, ce qui n'est pas toujours le cas.

II. c. 4. La spectroscopie de fluorescence

Cette méthode d'analyse spectroscopique qui repose sur les propriétés de fluorescence des molécules, présente une très grande sensibilité et permet de quantifier les interactions protéine/ligand. Pour les protéines, seuls les résidus aromatiques (Phe, Tyr, Trp) présentent une fluorescence intrinsèque qui peut être utilisée directement. Ce test est le plus récent car il nécessite d'avoir des informations structurales, en particulier de connaître la position des résidus aromatiques dans la structure, afin de prédire leur comportement lors de la fixation du ligand. En effet, la fixation du ligand provoque un changement de conformation de la protéine qui induit une modification de l'émission de fluorescence des résidus aromatiques. Lorsque cela est possible, la mesure de fluorescence intrinsèque est la méthode de choix, puisqu'elle renseigne directement sur l'affinité de la protéine pour ses ligands (Wei *et al.*, 2008).

Dans le cas de l'OBP porcine, un seul tryptophane est présent en position 16 (celui du motif GXW des lipocalines), mais la structure tridimensionnelle révèle qu'il se situe entre le fond de la cavité et l'extérieur de la protéine (Spinelli *et al.*, 1998). Il n'est donc pas en contact avec les molécules odorantes qui se fixent dans la cavité hydrophobe ou avec l'environnement de la protéine, ce qui ne permet pas des études de liaison directe. Des tests de liaison indirecte, ou de déplacement, ont été développés. Une sonde fluorescente, qui est donc un ligand pour la protéine, est introduite dans la cavité hydrophobe jusqu'à saturation. Les ligands dont l'affinité doit être mesurée sont ensuite ajoutés en concentration croissante jusqu'au déplacement de la sonde fluorescente vers l'extérieur de la protéine, entraînant une diminution de l'intensité de fluorescence de la sonde liée et l'apparition à une autre longueur d'onde de l'émission de la sonde libre. Les mesures peuvent alors permettre le calcul d'une valeur d'IC50 correspondant à la concentration nécessaire pour diminuer l'intensité de fluorescence de la sonde de 50%.

Le choix de la sonde est délicat puisqu'elle doit avoir une affinité pour une protéine donnée, mais pas trop forte pour permettre aux ligands spécifiques d'entrer dans la protéine. L'1-aminoanthracène est utilisé en routine par plusieurs équipes pour étudier les propriétés de liaison de l'OBP porcine. C'est un bon ligand pour l'OBP, car sa structure aromatique (Figure 12) est proche de celle d'autres molécules considérées comme de bons ligands (aromatiques polycycliques, Paolini *et al.*, 1999; Loëbel *et al.*, 2000). Elle se lie à l'OBP avec une constante de dissociation (Kd) de 1,3 μM pour la protéine purifiée des tissus (native, Paolini *et al.*, 1999) et de 1,6 μM pour l'OBP recombinante produite par *E. coli* (Wei *et al.*, 2008).

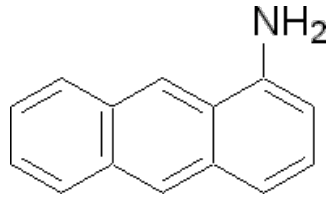


Figure 12: Structure chimique de l'1-aminoanthracène

Les propriétés de liaison de la SAL ont été très peu étudiées par comparaison avec l'OBP. Une étude a comparé les propriétés de liaison de la SAL native et de la SAL recombinante exprimée par la bactérie *E. coli*, avec l'1-AMA comme sonde fluorescente (Loëbel *et al.*, 2000). Comme attendu, la protéine recombinante ne porte pas de N-glycosylation, la bactérie étant incapable de la synthétiser. Le K_d mesuré pour l'1-AMA est de 12 μM pour la protéine native et de 9 μM pour la protéine recombinante (Loëbel *et al.*, 2000). Les auteurs attribuent cette mauvaise affinité pour l'1-AMA à la présence de ligands endogènes de forte affinité (stéroïdes sexuels). Cependant, la protéine recombinante ne peut pas contenir de tels ligands, mais peut-être des acides gras ou du cholestérol présents dans le milieu de culture (Loëbel *et al.*, 2000). Des tests de déplacement montrent que le meilleur ligand pour la SAL native et la SAL recombinante est l'androsténone, l'un des ligands naturels. Enfin, les auteurs concluent que l'affinité des deux SAL pour les ligands testés est comparable, et que donc la chaîne N-glycannique n'a pas d'influence sur les propriétés de liaison (Loëbel *et al.*, 2000).

Enfin, la spectroscopie de fluorescence n'a pas été utilisée pour la VEG, sans doute pour la même raison que pour les données cristallographiques. La VEG est très difficile à purifier, à exprimer en système hétérologue et jusqu'à récemment, ses ligands naturels étaient inconnus. Le test de liaison sur gel montre une très forte affinité entre la VEG1 et la testostérone (Le Danvic *et al.*, 2009), suggérant que cette liaison est particulièrement difficile à déplacer. Encore une fois, les seuls renseignements viennent de la TL humaine, dont les propriétés de liaison de la forme recombinante bactérienne ont été analysées (Breustedt *et al.*, 2006). Cependant, les ligands employés ne sont pas très intéressants d'un point de vue biologique: rétinol et acide rétinoïque d'une part (ligands de la Retinol Binding Protein), ANS (8-anilino-1-naphtalène) et DAUDA (acide undécanoïque 11-(5-(diméthylamino)-1-naphtalène-sulfonylamino) d'autre part, qui sont des sondes fluorescentes. Le résultat le plus intéressant est que le DAUDA est le meilleur ligand ($K_d=1,6 \mu\text{M}$, du même ordre de grandeur que l'1-AMA avec l'OBP) et qu'il pourrait donc être utilisé comme sonde fluorescente pour l'étude des propriétés de liaison de la VEG (Breustedt *et al.*, 2006).

III. Les modifications post-traductionnelles

Les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles sont responsables de la complexification du protéome (ensemble des protéines). Le premier mécanisme est l'épissage alternatif qui permet d'accroître la diversité des ARN messagers et le second mécanisme est les modifications post-traductionnelles (Figure 13).

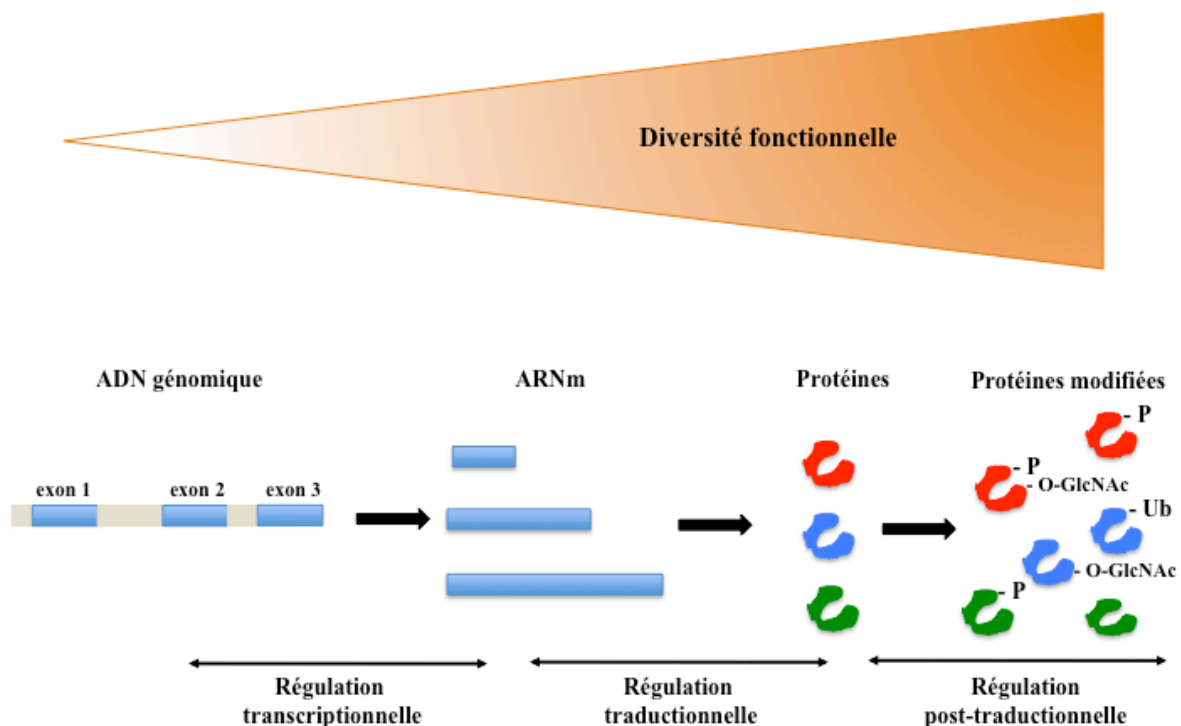


Figure 13 : Schéma représentant la mise en place de complexité du protéome s'établissant au cours des étapes successives conduisant à la synthèse des protéines. Un gène est à l'origine de plusieurs protéines qui auront des fonctions biologiques particulières. Le gène est transcrit en pré-ARNm qui grâce au phénomène d'épissage alternatif pourra donner plusieurs ARNm matures. La traduction des ARNm conduit à la synthèse de protéines qui vont subir des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, glcNAcylation, ...)(d'après Vosseller et al., 2001).

Les protéines au cours de leur maturation vont subir des modifications post-traductionnelles (MPT). Il en existe différents types: les glycosylations, les phosphorylations, l'acétylation, l'ubiquitination, la méthylation. Ces MPT se déroulent après la traduction de la protéine dans le cytoplasme des cellules. La modification post-traductionnelle la plus rencontrée est la phosphorylation puis vient ensuite la glycosylation. Il existe différents types de glycosylations, consistant toutes en un transfert de structures mono- ou oligo-

saccharidiques sur des protéines données par différentes glycosyltransférases. La glycosylation joue des rôles majeurs au sein de la physiologie cellulaire, par exemple en stabilisant la structure tridimensionnelle des protéines sous leur forme active et en les protégeant des attaques protéolytiques. Les voies de biosynthèse de glycoprotéines membranaires et sécrétées sont aujourd'hui connues avec la présence de glycosyltransférases orientées vers la lumière du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi (Hirschberg & Snider, 1987). Mais il existe d'autres types de glycosylation présents au sein des compartiments nucléaires et cytoplasmiques tels que des résidus de *O*-N-acétylglucosaminylation liés sur l'hydroxyle de résidus sérine ou thréonine des protéines cytoplasmiques et nucléaires (Holt & Hart, 1986; Holt *et al.*, 1987). La *O*-N-acétylglucosaminylation appelée GlcNAcylation est majoritairement présente dans le cytosol et le noyau (Holt & Hart, 1986; Kearse & Hart, 1991a) où elle est particulièrement abondante au niveau des pores nucléaires (Hanover *et al.*, 1987). Il existe également des modifications post-traductionnelles chez les procaryotes mais les motifs restent atypiques en comparaison des modifications chez les eucaryotes.

III. a. *O*-N-acétylglucosaminylation

La *O*-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle qui a été mise en évidence pour la première fois en 1984 (Torres & Hart, 1984), et depuis de nombreuses protéines ont été découvertes qui possèdent cette modification. Les rôles de ces protéines modifiées sont très variés, comme par exemple des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette, des suppresseurs de tumeur, des oncogènes, des protéines virales, des kinases, des phosphatases, des protéines de choc thermique, des enzymes cytosoliques, ou des protéines du pore nucléaire. Son implication dans les mécanismes fondamentaux de la vie cellulaire laisse penser que la GlcNAcylation est apparue très tôt dans l'évolution. En effet, elle a été retrouvée dans d'autres organismes que chez les eucaryotes. Elle a été retrouvée chez les Procaryotes comme la bactérie *Listeria monocytogenes* (Schirm *et al.*, 2004) jusqu'aux métazoaires y compris les mammifères, les amphibiens (Fang & Miller, 2001; Slawson *et al.*, 2002). Elle a été également trouvée chez le ver nématode *Caenorhabditis elegans* (Hanover *et al.*, 2005), les insectes tels que la drosophile (Kelly & Hart, 1989) et les plantes (Swain *et al.*, 2001). Et enfin, elle est présente même chez les virus comme le SV40 (Medina *et al.*, 1998) et le cytomégalovirus (Greis *et al.*, 1994).

La *O*-N-acétylglucosaminylation consiste en un ajout d'un unique monosaccharide, la N-acétyl-D-glucosamine, lié au niveau d'un acide aminé hydroxylé soit sur une sérine soit sur

une thréonine d'une protéine par l'intermédiaire d'une liaison β . C'est une glycosylation particulière que l'on retrouve en abondance dans le cytosol et dans le noyau (Holt & Hart, 1986; Kears & Hart, 1991b) contrairement aux N-glycosylations qui sont présentes dans le réticulum endoplasmique rugueux en modifiant les protéines qui empruntent la voie de sécrétion des protéines soit le RER puis l'appareil de golgi et enfin les vésicules de sécrétion qui dirigent les protéines vers l'extérieur de la cellule.

III. a. 1. Les sites de la O-GlcNAc

Il n'existe pas de site consensus de la O-GlcNAc contrairement à la N-glycosylation. En effet, cette modification a pour séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (sachant que le X peut correspondre à n'importe quel acide aminé à par la proline). Cette séquence permet ainsi la greffe d'un N-glycane sur la protéine. Pour la O-GlcNAc, il existe des conditions permettant la greffe d'un monosaccharide sur la protéine, tel que la présence d'un résidu de proline à proximité du site de O-GlcNAc ainsi qu'une séquence riche en sérine et thréonine autour de ce site (Figure 14). Ainsi des sites de O-GlcNAc ont été identifiés pour certaines protéines : la sérine 16 du récepteur murin des oestrogènes mER β (Cheng & Hart, 2001) et la thréonine 58 de la protéine c-Myc (Chou *et al.*, 1995). Des études de spécificité de substrat de la O-GlcNAc transférase (Haltiwanger *et al.*, 1990), qui transfère le monosaccharide sur la protéine, ont permis d'établir que certains sites de O-GlcNAc sont similaires à ceux reconnus par un certain nombre de kinases (Vulliet *et al.*, 1989), suggérant que O-GlcNAc et phosphorylation peuvent se retrouver sur le même site.

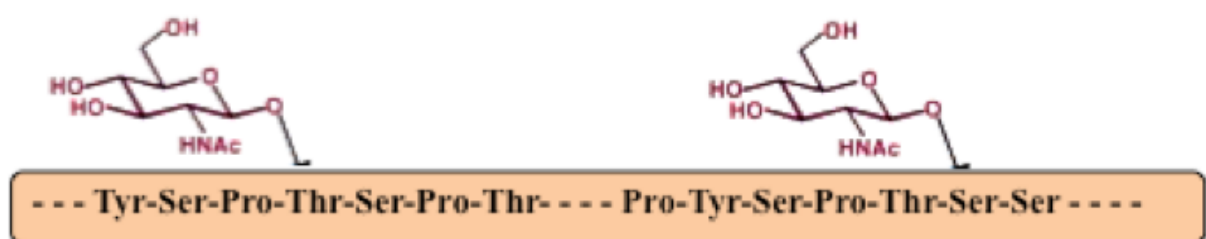


Figure 14 : Représentation schématique d'un polypeptide modifié par GlcNAcylation

III. a. 2. Les enzymes de la O-GlcNAc :

La O-GlcNAc, dans la littérature est une glycosylation retrouvée soit dans le cytosol soit dans le noyau. Ainsi les enzymes responsables de l'attachement et de la suppression de la O-GlcNAc sur la protéine sont retrouvés également dans les mêmes compartiments cellulaires.

La GlcNAcylation est régulée par uniquement un couple d'enzymes : β -N-acétylglucosaminyltransférase (*O*-GlcNAc transférase ou OGT) qui va catalyser le transfert de la GlcNAc sur la protéine et la N-acétyl- β -D-glucosaminidase (*O*-GlcNAcase ou OGA) qui assure l'hydrolyse du résidu (Figure 15).

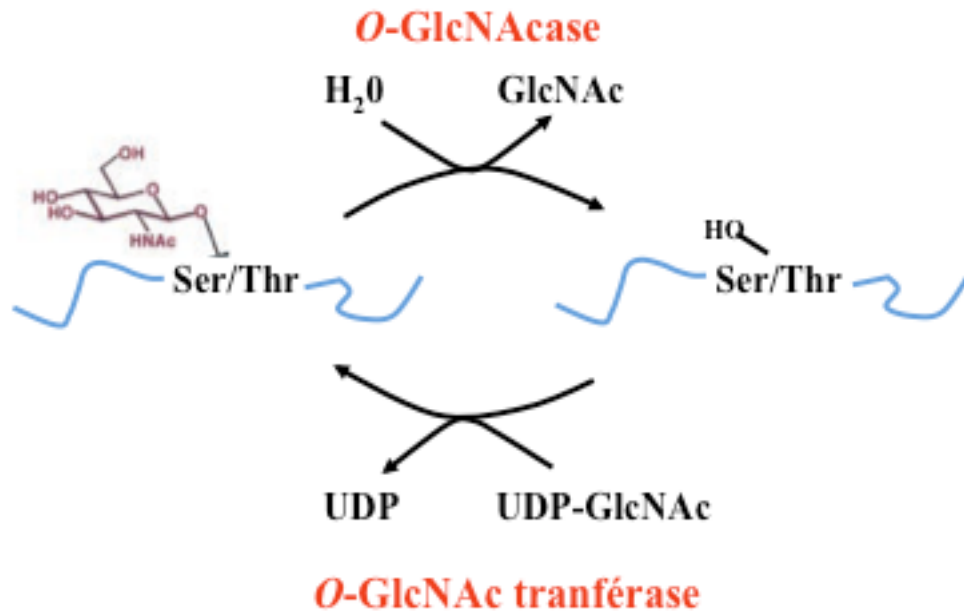


Figure 15 : La GlcNAcylation, une modification post-translationnelle dynamique et réversible

III. a. 2. α . OGT : Structure, caractéristique et régulation

Davis et Blodel (1987) démontrent la présence d'une glycosylation cytosolique suggérant ainsi l'existence d'une enzyme capable de transférer le résidu N-acétylglucosamine dans le même compartiment cellulaire. En 1990, Haltiwanger identifie dans le cytosol de foie de rat l'uridine diphospho-N-acétylglucosaminyltransférase (*O*-GlcNAc transférase ou OGT), responsable de l'addition enzymatique du résidu de N-acétyl-D-glucosamine sur des protéines nucléaires et cytosoliques (Haltiwanger *et al.*, 1990 ; Haltiwanger *et al.*, 1992).

La caractérisation de l'OGT a permis de montrer la présence de 3 isoformes de cette protéine. L'isoforme nommée ncOGT (« nuclear and cytoplasmic OGT ») existe sous la forme d'un hétérodimère constitué de trois sous-unités identiques de 110 kDa (p110; Kreppel *et al.*, 1997) et possède une expression ubiquitaire. Contrairement à ncOGT, l'expression de sOGT (« Small OGT »), constitué d'une sous unité à 78 kDa, n'est trouvée que dans le foie, les reins et les muscles. La sOGT ne possède aucune activité catalytique *in vitro* (Lazarus *et al.*, 2006) et elle aurait un rôle uniquement de régulation. La dernière isoforme de masse moléculaire 103 kDa, nommée mOGT (« mitochondrial OGT ») a été découverte en 2003 et mise en évidence au niveau de la membrane interne mitochondriale. La mOGT possède une

activité catalytique *in vitro* (Love *et al.*, 2003) et récemment son activité *in vitro* à été démontrée par la mise en évidence de la GlcNAcylation de protéines mitochondriales (Hu *et al.*, 2009).

L'OGT est constituée de deux domaines distincts, le domaine C-terminal portant l'activité catalytique et le domaine N-terminal qui émet l'interaction protéine-protéine (Kreppel *et al.*, 1997 ; Lubas *et al.*, 1997). Ces deux domaines sont reliés entre eux par un domaine intermédiaire flexible adoptant une conformation en sillon superhélicoïdal. (Martinez-Fleites *et al.*, 2008). La région C-terminal est divisée en deux domaines, les domaines catalytiques I et II (CDI et CDII; Roos & Hanover, 2000). Le CDI est le domaine portant l'activité catalytique tandis que le CDII permet la liaison au substrat de l'OGT, l'UDP-GlcNAc, en utilisant une activité de type lectine (Wrabl & Grishin, 2001). Les données cinétiques suggèrent que l'OGT fonctionne selon un mécanisme enzymatique bi-bi-aléatoire, c'est-à-dire que les sites de fixation ses substrats (UDP-GlcNAc et protéine acceptrice) sont accessibles sur l'enzyme libre et indépendants (Kreppel & Hart., 1999). La région N-terminal contient des motifs TPR ou « tetratricopeptides repeats ». Les TPR sont des motifs de 34 acides aminés contenant la séquence consensus WLGYAFAP, fortement conservés au cours de l'évolution, et dont les localisations cellulaires sont variées. Les TPR sont impliqués dans la reconnaissance protéine-protéine et de fixation de substrats (Lamb *et al.*, 1995 ; Das *et al.*, 1998).

L'OGT est codée par un unique gène qui est très conservé au cours de l'évolution puisqu'il est retrouvé de *C. elegans* jusqu'à l'Homme (Lubas *et al.*, 1997) montrant ainsi un rôle importance de la O-GlcNAc. Chez les mammifères, ce gène est localisé sur le chromosome X dans la région Xq13.1 (Shafi *et al.*, 2000; Nolte & Müller, 2002). Il doit donc exister un mécanisme de régulation de l'enzyme, pouvant conférer une spécificité temporelle et de substrat, notamment en réponse aux signaux cellulaires. La figure 16 met en évidence les différentes régulations possibles de l'OGT. Ainsi, les modifications post-traductionnelles sont un moyen possible de régulation de l'OGT. En effet, l'enzyme est elle-même modifiée par la O-GlcNAc, mais également par la phosphorylation de résidu de tyrosine (Kreppel *et al.*, 1997). Il a été montrée que la calmoduline kinase de type IV (CaMKIV) phosphoryle l'OGT étant ainsi responsable de l'activation de l'enzyme (Song *et al.*, 2008). L'activité de l'OGT pourrait être régulée par des interactions avec différentes protéines. Les domaines TPR sont importants pour la multimérisation de l'enzyme mais la multimérisation n'est pas responsable de l'activité de l'OGT. Par contre elle influe sur l'affinité pour son substrat. Enfin, l'activité de l'enzyme est dépendante du taux en UDP-GLcNAc intracellulaire. Pour l'OGT

recombinante de rat (Kepper & Hart, 1999), il existe ainsi trois Km distinct (6 μ M, 35 μ M et 217 μ M) pour UDP-GlcNAc montrant ainsi que l'activité de l'OGT est donc dépendants des niveaux de UDP-GlcNAc intracellulaires.

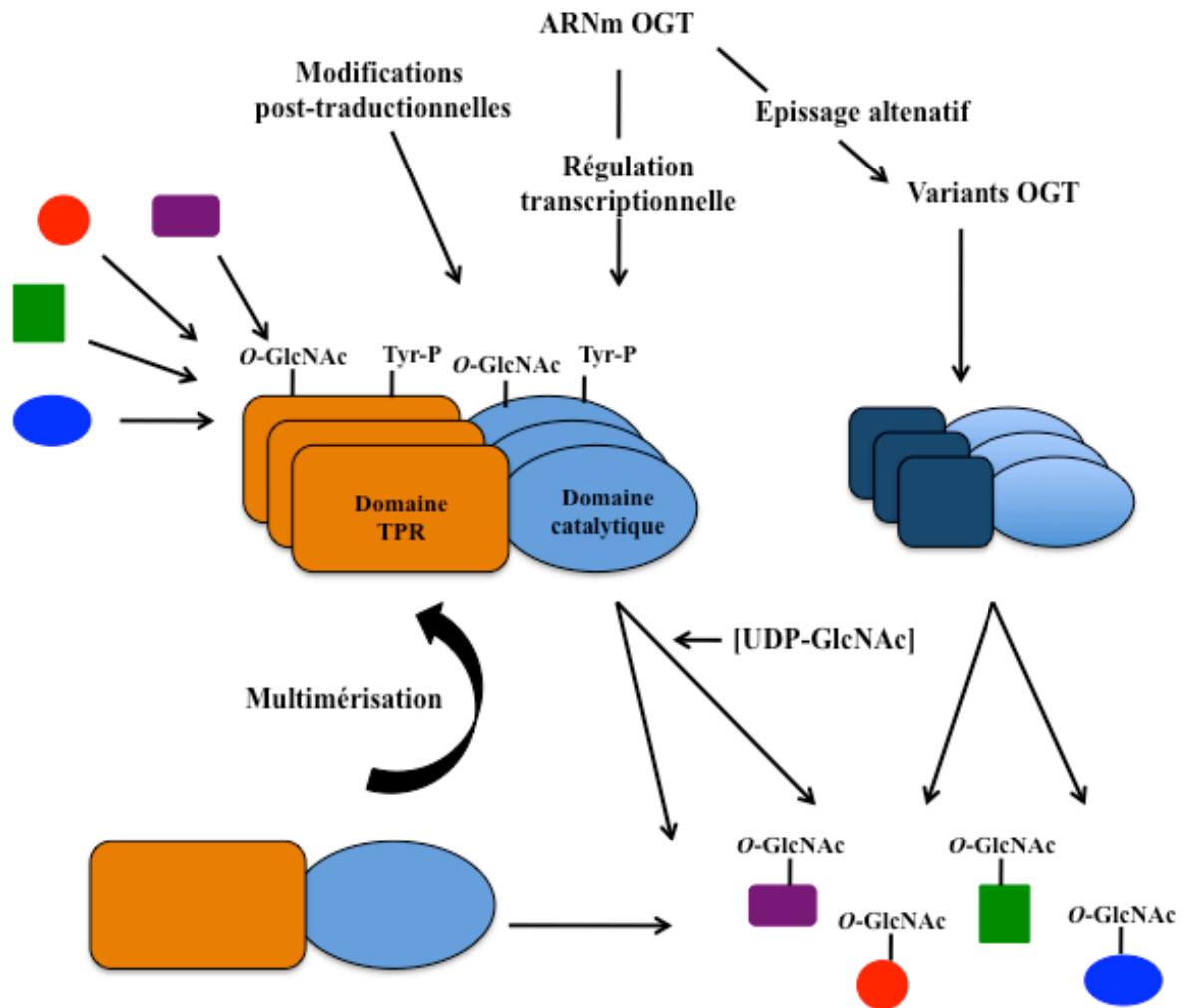


Figure 16 : Mécanisme de régulation possibles de l'OGT : régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, multimérisation et interactions de protéines accessoires ou de substrats avec la région TPR (d'après Comer & Hart, 2000).

III. a. 2. β . OGA : structure, caractéristique et régulation

La GlcNAcase, spécifique de l'hydrolyse des résidus de *O*-GlcNAc, a été purifiée et caractérisée en 1994 à partir de rate de rat (Dong & Hart, 1994) puis clonée en 2001 (Gao *et al.*, 2001). Cette enzyme clive spécifiquement les résidus de GlcNAc dont le carbone C1 est engagé dans une liaison d'anomérie β .

Des isoformes de la *O*-GlcNAcase ont été identifiées chez l'Homme, une isoforme de 130 kDa et l'isoforme de 75 kDa résultant d'un épissage alternatif (Heckel *et al.*, 1998;

Comtesse *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2001; Figure 17). Les deux isoformes sont exprimées de façon ubiquitaire dans les compartiments cytosolique et nucléaire et plus particulièrement dans le cerveau (Comtesse *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2001). Toutes les isoformes d'OGA possèdent une activité glucosaminidase *in vitro* (Kim *et al.*, 2006) même si l'OGA de pleine taille représente l'essentiel de l'activité *O*-GlcNAcase (Wells *et al.*, 2002a). De plus, l'épissage alternatif des transcrits du gène de l'OGA a permis chez le rat d'avoir deux isoformes supplémentaires de la *O*-GlcNAcase de 90 et 84 kDa (Toleman *et al.*, 2004).

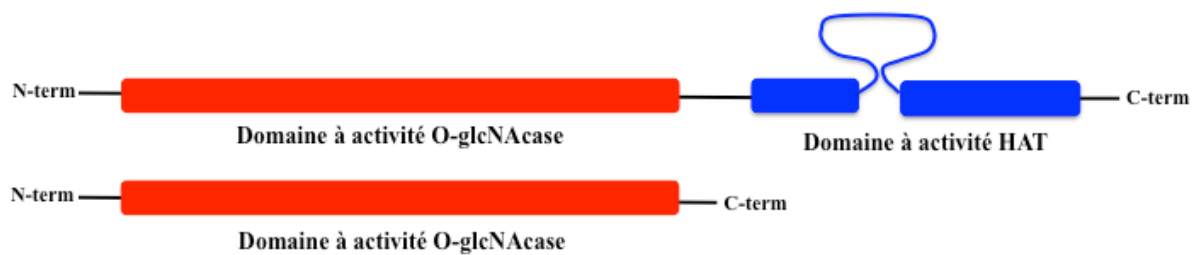


Figure 17 : Représentation schématique des deux isoformes de l'OGA (130 kDa et 75 kDa) et ses domaines *O*-GlcNAcase et HAT (Histone AcétylTransférase)

La structure de la GlcNAcase n'est pas totalement connue. Toutefois, il apparaît que l'activité catalytique de l'enzyme réside dans la partie N-terminal (Toleman *et al.*, 2004). En effet, deux résidus d'aspartate ont été caractérisés chez l'homme, Asp 174 et 175, qui sont indispensables dans l'activité *O*-GlcNAcase de l'enzyme (Cetindas *et al.*, 2006). En plus de son activité glucosaminidase, la *O*-GlcNAcase possède une activité acétyltransférase (HAT). Ce domaine HAT présente une structure en « doigt de zinc » et se situe dans la partie C-terminal de l'enzyme (Toleman *et al.*, 2006).

La *O*-GlcNAcase peut subir également des Modifications post-traductionnelles. En effet, elle est modifiée *O*-GlcNAc (Lazarus *et al.*, 2006) suggérant un rôle de l'OGT sur la *O*-GlcNAcase. L'enzyme peut être clivée par la caspase 3 qui va générer ainsi un fragment C-terminal de 65 kDa. Ce fragment possède toujours son activité *O*-GlcNAcase et HAT (Toleman *et al.*, 2004). La signification biologique de ce clivage n'est pas encore comprise mais suggère un rôle potentiel de la *O*-GlcNAcase dans l'apoptose par déglycosylation de protéines essentielles à la mort cellulaire programmée. L'enzyme peut s'associer avec d'autres protéines tels que des protéines de choc thermique (Hsc70 et HSP110) mais le rôle des partenaires dans l'activité de l'enzyme n'est pas encore connu.

III. a. 3. L'UDP-GlcNAc, substrat de l'OGT

Le sucre donneur de la *O*-GlcNAc est l'uridine 5'-diphospho-N-acétylglucosamine ou UDP-GlcNAc qui est issu de la voie de biosynthèse des hexosamines. L'activité de l'OGT est dépendante de la synthèse de l'UDP-GlcNAc et donc de l'activité de cette voie de biosynthèse. Une fois transporté dans la cellule, le glucose est rapidement converti en glucose-6-phosphate. Ce dernier est alors soit converti en glucose-1-phosphate, pour entrer dans la voie de synthèse du glycogène, soit converti en fructose-6-phosphate. Le fructose-6-phosphate va préférentiellement entrer dans la voie de la glycolyse, mais une petite portion (de l'ordre de 2 à 5%) va entrer dans la voie des hexosamines. Le fructose-6-phosphate est alors converti en N-acétylglucosamine-6-phosphate, avec conversion concomitante de la glutamine en glutamate. L'enzyme responsable de cette réaction est la glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase ou GFAT, enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines. La N-acétylglucosamine-6-phosphate est ensuite rapidement convertie en N-acétylglucosamine-1,6-diphosphate puis en uridine 5'-disphospho-N-acétylglucosamine (Marshall *et al.*, 1991). Cet UDP-GlcNAc pourra alors servir de donneur pour la glycosylation de lipides et de glycoprotéines sécrétées ou membranaires, pour la *O*-N-acétylglucosaminylation (Figure 18).

La concentration de l'UDP-GlcNAc exerce un rétrocontrôle sur l'activité de la GFAT : lorsque la concentration de l'UDP-GlcNAc augmente, l'activité de la GFAT sera diminuée, et on observe également une augmentation de la *O*-GlcNAc sur les protéines nucléaires et cytosoliques.

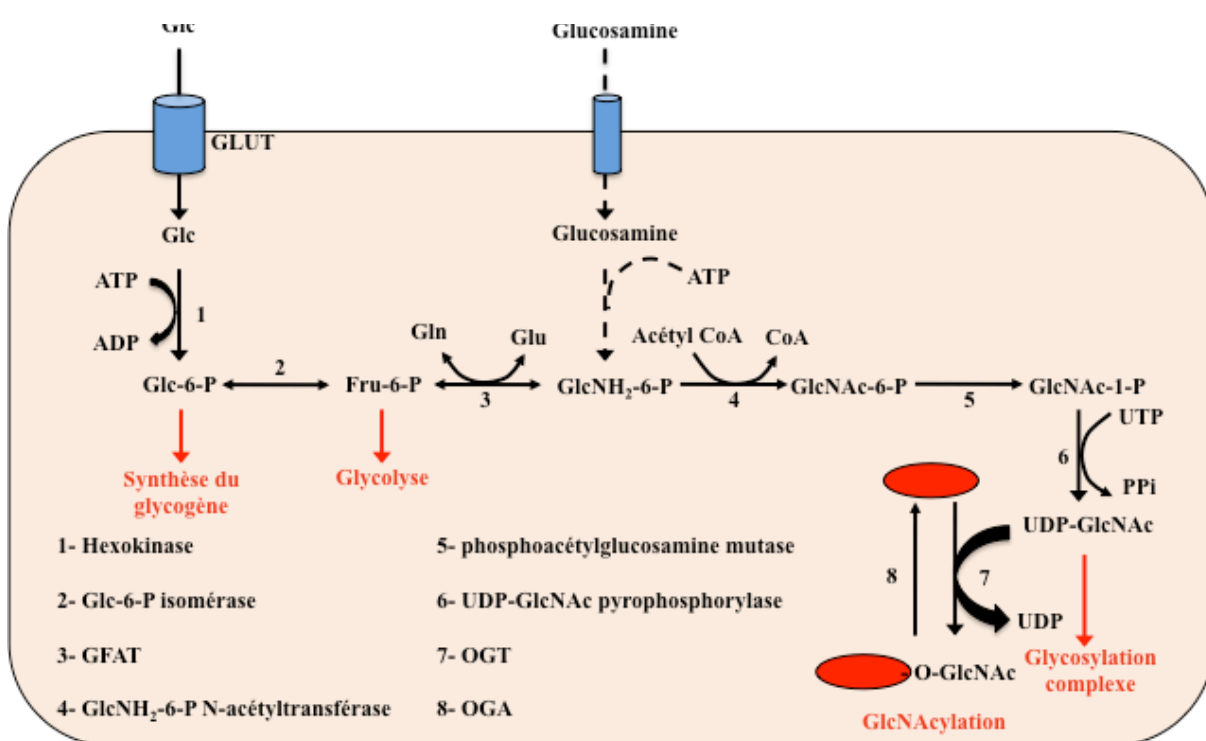


Figure 18 : La voie de biosynthèse des hexosamines

III. b. Les phosphorylations

La phosphorylation des protéines a été découverte chez les eucaryotes au milieu des années 50 avec l'étude du métabolisme du glycogène (Krebs & Fisher, 1955; Cohen, 2002). Elle a commencé à se développer au cours des années 70 pour prendre l'importance que l'on connaît aujourd'hui. De façon surprenante, la découverte de la phosphorylation des protéines chez les procaryotes a été beaucoup plus tardive, et il a fallu attendre la fin des années 70 pour sa mise en évidence (Wang & Koshland, 1978; Cozzone, 1998).

La phosphorylation est considérée comme le premier mécanisme de régulation de l'activité de nombreuses protéines et elle joue un rôle primordial dans l'adaptabilité des cellules (Schenk & Snaar-Jagalska, 1999; Hunter, 2000; Cohen, 2002). La réaction de la phosphorylation est l'estérification de la chaîne latérale d'un résidu par l'addition d'un ou plusieurs groupements phosphates. Cette modification peut changer l'activité ou la stabilité d'une protéine, notamment en induisant des changements de conformation de la chaîne protéique.

III. b. 1. Les sites des phosphorylations

Chez les eucaryotes, la phosphorylation des résidus sérine, thréonine et tyrosine est la plus étudiée (Cheek et al., 2005; Figure 19). La phosphorylation des résidus histidines est de plus en plus étudiée mais reste toujours mal connue. La phosphorylation des résidus Arginine, Lysine, Asparagine, glutamine et cystéine reste marginale chez les eucaryotes.

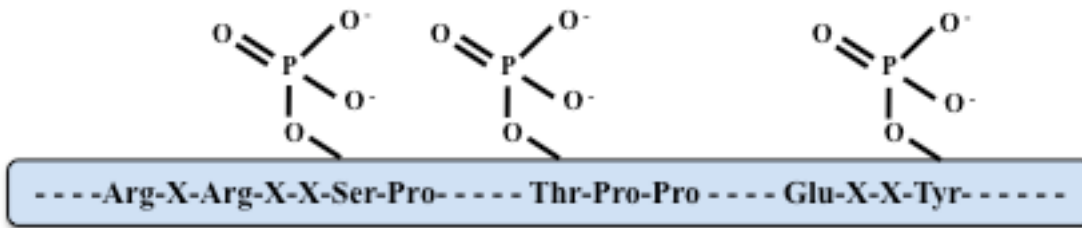


Figure 19 : Représentation schématique d'un polypeptide modifié par phosphorylation

III. b. 2. Les enzymes des phosphorylations

Les phosphorylations sont contrôlées par des enzymes appelées protéines kinases qui catalysent le transfert d'un phosphate d'une molécule donneuse, généralement un nucléoside triphosphate, vers une protéine acceptrice. Ce mécanisme est contrebalancé par des protéines phosphatases qui catalysent l'hydrolyse du résidu phosphorylé et permettent une régulation fine du système (Figure 20).

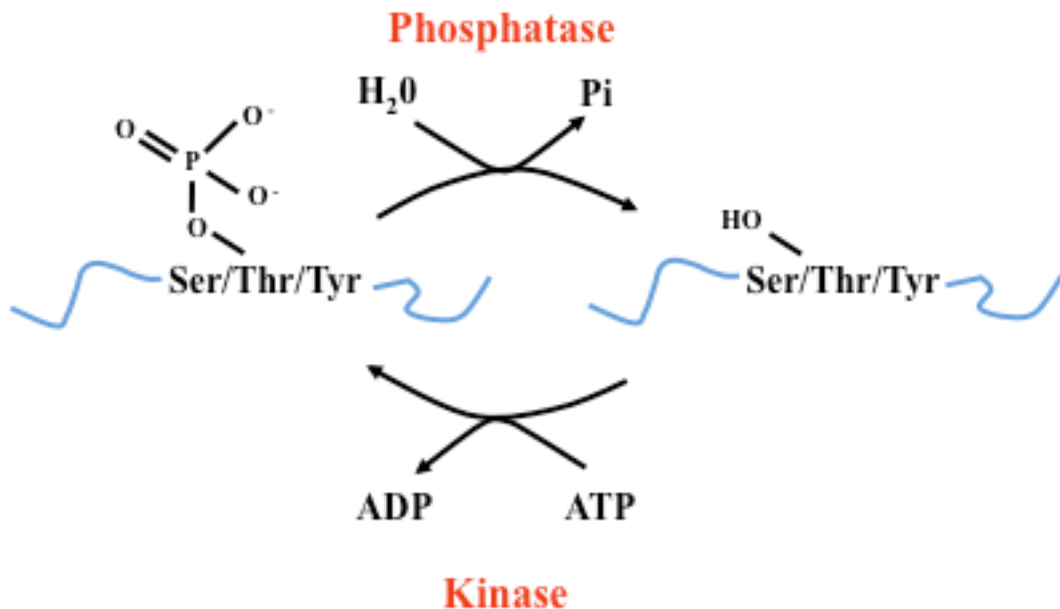


Figure 20 : La phosphorylation, une modification post-traductionnelle dynamique et réversible

III. b. 2. a. les protéines kinases

Les protéines kinases sont ubiquitaires. On peut distinguer cinq classes de protéines kinases en fonction de la nature chimique de l'acide aminé accepteur : alcool (Sérine et

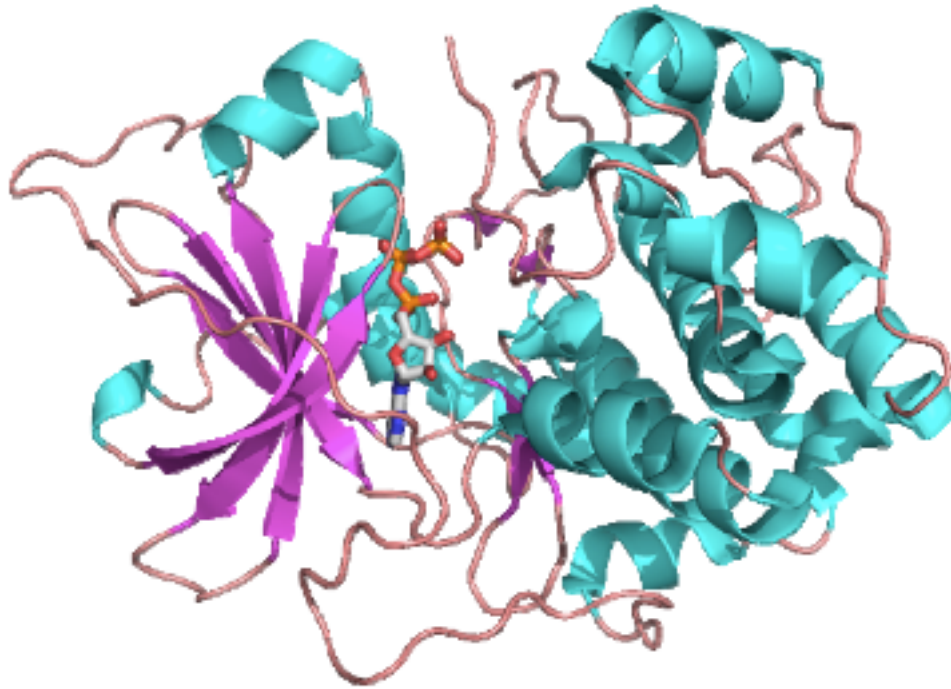
Thréonine), phénol (Tyrosine), azote (Histidine, Arginine et Lysine), thioester (Cystéine) et acide (Asparagine et glutamine). Les Ser/Thr et Tyr-kinases sont des enzymes nucléoside triphosphate-dépendantes et forment une grande famille très conservée, séquentiellement et structurellement, appelée famille de Hanks (Hanks *et al.*, 1988). Les His/Arg/Lys, Asp/Glu et Cys-kinases ne présentent aucune similarité de séquence ni de structure avec les kinases de la famille de Hanks. Chez les procaryotes, les protéine-kinases se trouvent essentiellement dans le système à deux composants ainsi que dans le système sucre. En revanche, des Ser/Thr et Tyr-kinases ATP dépendantes de type eucaryote ont été trouvées (Cozzone, 1998).

Ces enzymes se retrouvent impliquées dans le métabolisme, l'expression des gènes, la division cellulaire, la motilité et la différenciation chez les eucaryotes (Schenk & Snaar-Jagalska, 1999; Hunter, 2000). Chez les procaryotes, elles régulent la réponse au stress, la motilité et le métabolisme (Zhang *et al.*, 2005).

Bien qu'elles varient considérablement en longueur, en séquence primaire et dans leur fonction cellulaire, les alignements de séquence permettent d'identifier un domaine catalytique conservé de 250 à 300 résidus. Ce dernier est caractérisé par sept résidus invariants et onze à douze sous-domaines (Hanks *et al.*, 1988 ; Wei *et al.*, 1994).

Les Ser/Thr-kinases possèdent un motif Gly-X-Gly-X-X-Gly suivi de 15 à 20 résidus puis une lysine. Ce motif, parfois appelé boucle glycine (glycine loop), sert à maintenir les phosphates β et γ du nucléoside-triphosphate et la lysine est essentielle à la réaction enzymatique. 80 à 180 résidus plus loin, se trouve une région de 60 acides aminés contenant les séquences conservés Arg-Asp-Leu, Asp-Phe-Gly, Ala-Pro-Glu qui contribuent à la structure du site actif (Hunter, 1991).

Les Tyr-kinases ont les mêmes caractéristiques que les Ser/Thr-kinases, avec en plus une tyrosine (site d'autophosphorylation) entourée de résidus acides entre les séquences Asp-Phe-Gly et Ala-Pro-Glu (Hunter, 1991). La structure du domaine catalytique des Ser/Thr et Tyr-kinases est également très conservée. Elle consiste en deux lobes séparés par une profonde crevasse où vient se nicher le donneur de phosphate, et où se retrouvent la plupart des résidus conservés (Wei *et al.*, 1994). Le petit lobe N-terminal fixe le nucléotide et est formé d'un feuillet β à cinq brins antiparallèles et d'une hélice α . Le lobe C-terminal, plus grand, est appelé domaine de fixation du substrat et est principalement hélicale (Figure 21). Les protéines kinases de type Hanks constituent une très grande famille structurale représentant 3 % du génome humain (Kostich *et al.*, 2002; Lander *et al.*, 2001) et sont responsables de 94 % des phosphorylations chez les eucaryotes (Matthews, 1995).



*Figure 21 : La protéine kinase A de Souris (code PDB : 1LR3).
La structure est colorée par type de structure secondaire : les brins β en magenta et les hélices α en cyan. Le nucléotide qui se situe dans la crevasse entre les deux sous-domaines est figuré en stick coloré par type d'atome.*

III. b. 2. β . Les protéines phosphatases

La classification des phosphatases (Figure 22) a été établie en premier lieu à partir de critères biochimiques. Les phosphatases ont été séparées en plusieurs groupes selon leur spécificité de substrats : PSP (phosphosérine/thréonine phosphatases) et PTP (phosphotyrosine phosphatases) constituent les deux plus grandes familles. Certaines phosphatases sont toutefois capables de déphosphoryler plusieurs substrats, comme les « dual-specificity » protéines phosphatases qui déphosphorylent des phosphosérines et phosphothréonines mais aussi des phosphotyrosines (Arino, 2002; Stark, 1996).

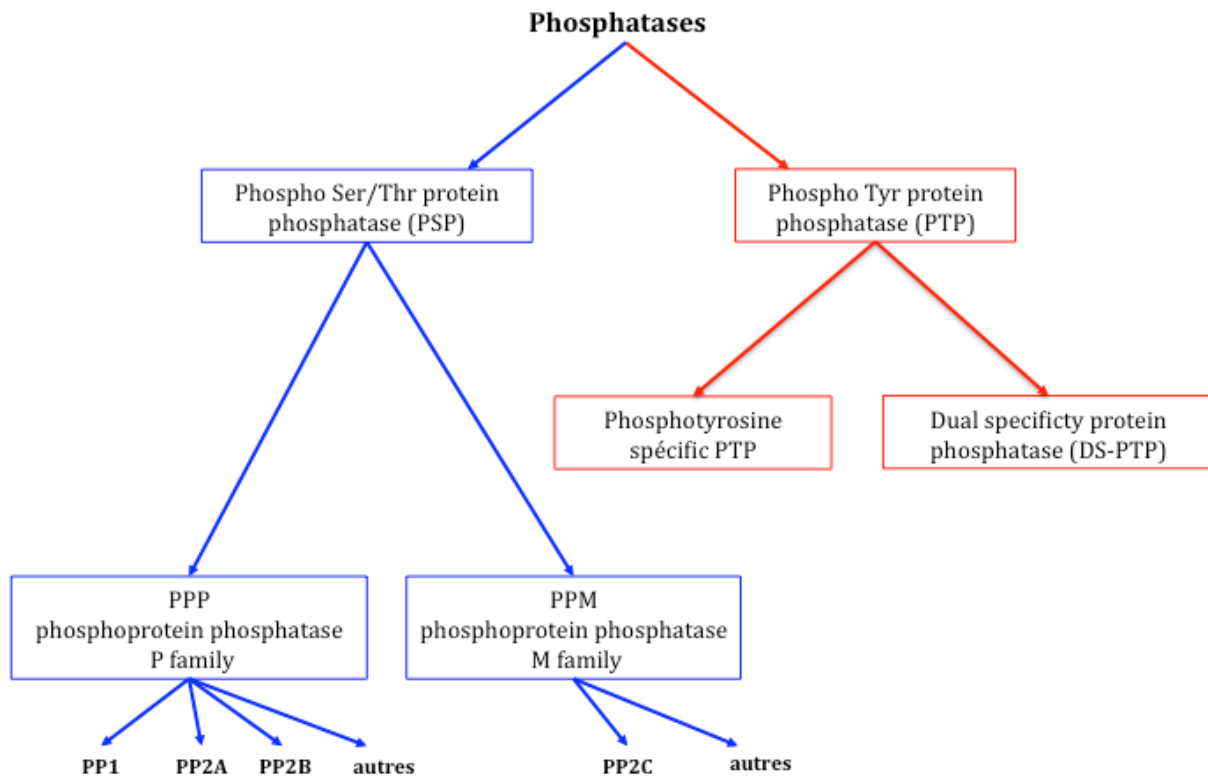


Figure 22 : Classification des phosphatases chez les eucaryotes

La famille des Ser/Thr-phosphatases est constituée de sous unités multiples qui s'associent entre elles. Les possibilités combinatoires sont donc plus grandes, ce qui permet une plus grande diversité et flexibilité. Cette famille est composée de sous famille les PP1 (protéine phosphatase de type 1) et les PP2 (protéine phosphatase de type 2).

Les PP1 sont des holoenzymes composées d'une sous-unité catalytique et d'une ou plusieurs sous-unités régulatrices. La PP1c (notation pour la sous-unité catalytique de la PP1) peut aussi se lier à des protéines qui inhibent son activité (Hubbard & Cohen, 1993). Cette enzyme est impliquée dans différent processus cellulaire telle que le métabolisme du glycogène, le transport du calcium, la contraction des muscles, la synthèse des protéine et le transport intracellulaire (Cohen, 1989; Bollen & Stalmans, 1992; Shenolikar & Nairn, 1990). La PP1 est une des protéines eucaryotes les plus conservées (Ceulemans & Bollen, 2004).

Les PP2 peuvent être sous-divisées en plusieurs classes. Les PP2A qui sont des holoenzymes trimériques constituées d'un cœur comportant une sous-unité catalytique complexée à une sous-unité régulatrice (ou sous-unité A) et une sous-unité régulatrice variable (sous-unité B) (Dickman & Yarden, 1999; Stark, 1996; Wera & Hemmings, 1995). Elle intervient dans le métabolisme, la contraction musculaire, la transmission synaptique et la progression du cycle cellulaire (Cohen, 1989; Hendrix *et al.*, 1993 ; Walter & Mumby, 1993; De Paoli-Roach *et al.*, 1994). Les PP2B ou calcineurines qui sont des hétérodimères dépendants de Ca²⁺, composés d'une sous-unité catalytique (ou calcineurine A) se liant à la

calmoduline et d'une sous-unité régulatrice (ou calcineurine B) qui lie le cation Ca^{2+} (Stemmer & Klee, 1991). Cette enzyme joue un rôle dans l'activation des lymphocytes T (Jain *et al.*, 1993). Les PP2C qui sont des enzymes monomériques dépendantes de Mg^{2+} (Cohen, 1989) et elle joue un rôle dans le signal de transduction dépendant du calcium dans le cerveau (Fukunaga *et al.*, 1993). Cette première classification ne rend pas compte des relations phylogénétiques entre les différentes classes. C'est pourquoi, après analyse des gènes codant les PSP, les PP1, PP2A et PP2B ont été regroupées dans la famille des PPP (« phosphoprotein phosphatase P family »), alors que les PP2C plus éloignées phylogénétiquement appartiennent à la famille PPM (« phosphoprotein phosphatase M family ») (Cohen, 1997; Dickman & Yarden, 1999; Wera & Hemmings, 1995). De nouvelles phosphatases structurellement proches des PPP mais clairement distinctes des PP1, PP2A et PP2B ont été identifiées (PP4, PP5, PP6, PPZ).

La famille des Tyr-phosphatases nommée PTP (protein Tyrosine phosphatase) est spécifique pour les protéines contenant des tyrosines phosphorylées même si certaines phosphatases de cette famille possèdent également une spécificité double puisqu'elles peuvent déphosphoryler les trois types de résidus (sérine, thréonine et tyrosine ; Barford, 1995). Elles sont caractérisées structurellement par une combinaison de domaines d'interactions protéiques et par un ou deux domaines catalytiques conservés avec un site actif sensible à l'oxydation et contenant un résidu cystéine. On distingue 4 familles de PTPs classées sur la base de leurs fonctions, de leurs structures et de la séquence en acide aminé de leurs domaines catalytiques (Alonso *et al.*, 2004). La Classe Cys-based PTPs composée des PTPs classiques (PTPs transmembranaires de type récepteur et PTPs non récepteurs), les « Dual specificity » (DSPs) qui déphosphorylent les tyrosines, sérines et thréonines phosphorylées. La classe II Cys-based PTPs qui sont des PTPs de bas poids moléculaire (LMPTP). Elles sont spécifiques des tyrosines et sont plus anciennes que celles de la classe I. En effet, des représentants de cette famille ont été trouvés chez les plantes et les procaryotes. La classe III Cys-based PTPs sont spécifiques des tyrosines et thréonines et ont évolué à partir d'une enzyme bactérienne. Ces PTPs sont représentées par trois régulateurs du cycle cellulaire: CDC25A, CDC25B et CDC25C. Elles déphosphorylent les cdk au niveau de leur extrémité inhibitrice N- terminale doublement phosphorylée sur thréonine et tyrosine. Cette réaction est indispensable pour l'activation de ces kinases afin de permettre la progression dans le cycle cellulaire. Elles sont elles mêmes régulées par phosphorylation. Les Asp-based PTPs sont les PTPs EyA. Elles utilisent un mécanisme catalytique différent basé sur un acide aspartique. Elles sont spécifiques des tyrosines et des sérines. Elles jouent un rôle important au cours de

l'embryogenèse. Malgré leur similarité dans les mécanismes catalytiques et dans la structure de leur site actif, les PTPs des classes I, II et III ont évolué indépendamment.

Le mécanisme catalytique est basé sur le résidu cystéine. La « boucle PTP » formée par le motif caractéristique des PTPs (H/V)C(X)5R(S/T) et un acide aspartique sont indispensables à l'activité catalytique et sont conservées dans les trois principales familles de PTPs. Le site actif cystéine est utilisé comme un nucléophile lors de la formation d'un état intermédiaire phospho-cystéinyl. Le résidu arginine agit comme un « substrat binding » et participe à la stabilisation de cet état transitoire intermédiaire. L'acide aspartique joue un rôle dans l'hydrolyse de la liaison thiophosphoryl (Denu & Dixon, 1998).

III. b. 3. L'ATP, substrat des protéines kinases

Les kinases pour phosphoryler une protéine ont besoin de l'ATP (adénosine triphosphate). La synthèse de l'ATP est réalisée à partir de la chaîne respiratoire mitochondriale (Figure 23). La phosphorylation oxydative constitue l'ensemble des processus orchestrés par la chaîne respiratoire, qui induit la synthèse de l'ATP à partir de l'oxygène moléculaire et des électrons issus des dinucléotides réduits NADH et FADH₂. Cette étape primordiale dans la production d'énergie de la cellule s'effectue au sein d'organelles appelées mitochondries, plus précisément au niveau de la membrane interne mitochondriale. La chaîne respiratoire est formée de cinq complexes protéiques principaux : la NADH déshydrogénase (Complexe I), la Succinate déshydrogénase (Complexe II), le complexe bc₁ (Complexe III), la cytochrome c oxydase (Complexe IV), l'ATP synthase (Complexe V). La phosphorylation oxydative est déclenchée au sein de cette chaîne protéique par la présence du dioxygène respiré et des électrons fournis par les dinucléotides réduits NADH et FADH₂. Les électrons transitent à travers la chaîne respiratoire, des complexes I et II jusqu'au complexe IV où ils sont consommés par réduction du dioxygène en eau. C'est pourquoi par ailleurs le complexe IV, la cytochrome c oxydase, est qualifié d'accepteur terminal d'électrons. Le transfert d'électrons consiste en une cascade de réactions d'oxydoréduction catalysées par les différents complexes protéiques. Ces réactions d'oxydoréduction fournissent de l'énergie libre qui est utilisée, dans le cas des complexes I, III et IV, pour le transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'énergie contenue dans ce gradient de protons permet la synthèse d'ATP au niveau du complexe V, l'ATP synthase (Saraste, 1999).

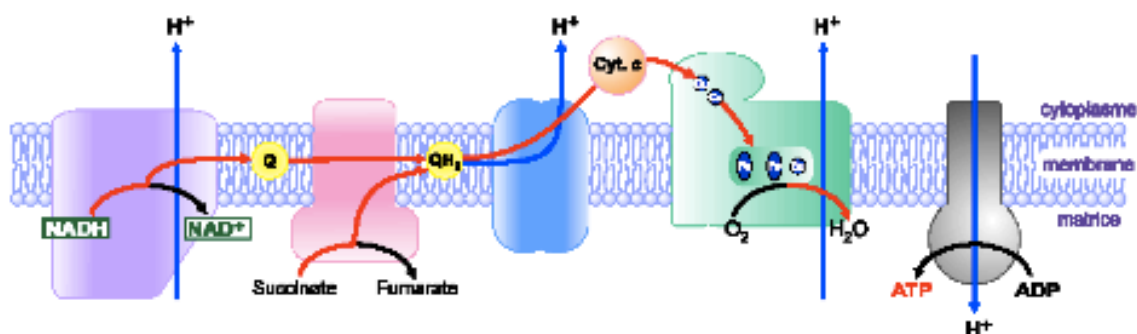


Figure 23 : Chaîne respiratoire mitochondriale (d'après Saraste, 1999). Le transfert d'électrons à travers les quatre premiers complexes est indiqué par les flèches rouges et le pompage de protons par les flèches bleues. La chaîne respiratoire est formée de cinq complexes protéiques principaux : la NADH déshydrogénase (Complexe I en violet), la Succinate déshydrogénase (Complexe II en rose), le complexe bc1 (Complexe III en bleu), la cytochrome c oxydase (Complexe IV en vert), l'ATP synthase (Complexe V en gris).

III. c. Le « Yin Yang » : GlcNAcylation et phosphorylation

La GlcNAcylation et la phosphorylation sont toutes les deux des modifications post-traductionnelles dynamiques et réversibles. L'identification des sites de GlcNAcylation et de phosphorylation a permis de mettre en évidence un lien entre ces deux modifications. En effet, une protéine pourra être soit glycosylée, soit phosphorylée, voire cette protéine possède les deux modifications. Il a été démontré que pour certaines protéines le même résidu ou un résidu adjacent peuvent être soit glycosylé soit phosphorylé. La théorie du « Yin Yang » a été élaborée à partir de ces observations. Le « Yin Yang » suggère que la *O*-GlcNAc et la phosphorylation entrent en compétition pour le même acide aminé soit la sérine soit la thréonine modulant ainsi la fonction de la protéine. Il existe quelques exemples dans la littérature montrant le phénomène « Yin Yang ». La modification de la sérine 16 du récepteur β murin aux oestrogènes influence l'activité et le « turnover » de la protéine (Cheng & Hart, 2001).

D'autres études ont montré que la relation pouvait être plus complexe, où les deux modifications post-traductionnelles entrent en compétition sur des résidus adjacents ou très proches. Ce cas est trouvé pour la protéine p53 (Yang *et al.*, 2006) dont la glycosylation de la sérine 149 diminue la phosphorylation sur la thréonine 155. Enfin, le degré de complexité est augmenté quand la compétition se fait sur un même résidu et sur des résidus adjacents. Ainsi, un grand nombre d'isoformes peuvent être obtenus à partir des combinaisons et chaque isoforme protéique peut avoir des propriétés physiques et biologiques différentes. C'est le cas pour le domaine C-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II qui présente des niveaux élevés

de GlcNAcylation et de phosphorylation (Kelly *et al.*, 1993 ; Comer & Hart, 2001) et également pour c-myc (Chou *et al.*, 1995; Kamemura & Hart, 2003).

La GlcNAcylation peut également jouer un rôle d'antagoniste sur la phosphorylation. Par exemple sur l'ARN polymérase II. La GlcNAcylation inhibe la phosphorylation sur le domaine C-terminal mais permet à l'ARN polymérase II de se positionner sur le promoteur afin de débiter la transcription. L'hydrolyse de la *O*-GlcNAc permet à la phosphorylation d'être activé sur le domaine et ainsi à l'assemblage du complexe d'élongation permettant à la transcription des ARNm de commencer (Comer & Hart, 2001). Un autre exemple montre que la phosphorylation d'une séquence PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) (Reschsteiner & Rogers, 1996) est un signal de la dégradation des protéines. Tandis la *O*-GlcNAcylation permet de protéger la protéine de la dégradation car le résidu *O*-GlcNAc bloque la phosphorylation. Ce cas a été montré sur le récepteur murin β des oestrogènes (Cheng & Hart, 2001).

Enfin la GlcNAcylation et la phosphorylation ne sont pas toujours antagonistes mais peuvent être synergiques ajoutant un niveau supplémentaire de complexité qui reste à clarifier.

III. d. Les rôles de la GlcNAcylation et de la phosphorylation

De nombreuses études démontrent l'importance de la *O*-GlcNAc et des phosphorylations dans de nombreux processus cellulaires. La plupart de ses fonctions sont associées entre ces deux types de MTP avec la théorie du « Yin Yang ». Ces modifications peuvent jouer des rôles individuels mais certaines des ces fonctions sont liée à l'antagoniste phosphorylation/GlcNAcylation telles que dans la régulation de l'expression des protéines et dans le cycle cellulaire. Toutefois, des dérégulations de ces mécanismes qui sont sous le contrôle de ces MPT peuvent être impliqués dans certaines pathologies telles que les maladies dégénératives et les cancers.

III. d. 1. La régulation dans l'expression des protéines et dans le cycle cellulaire associée aux MPT

La régulation de l'expression des gènes par la GlcNAcylation et la phosphorylation a été suggérée depuis que le CTD de l'ARN polymérase II a été décrit comme porteur de résidus *O*-GlcNAc et phosphate. L'ARN polymérase existe sous deux formes distinctes : la forme IIO, dont le CTD très conservé est considérablement phosphorylé sur des résidus sérines et thréonines, et la forme IIA, non phosphorylée. Par contre cette forme IIA est fortement modifiée par la *O*-GlcNAc, tandis qu'aucune GlcNAcylation n'a été trouvée sur la

forme IIO (Kelly *et al.*, 1993; Comer & Hart, 2001). Lors de la formation du complexe d'initiation, l'ARN pol II n'est pas phosphorylé. La phosphorylation du CTD de l'ARN pol II par des kinases spécifiques permet la transition de la phase d'initiation à la phase d'élongation, la phosphorylation jouant un rôle important dans l'interaction de l'ARN pol II avec certains facteurs d'élongation (Steinmetz, 1997). Ainsi, la relation « Yin Yang » qui s'exerce sur l'enzyme permet de réguler son activité (Comer & Hart, 2001).

Cette relation existe également pour certains facteurs de transcription tels c-myc, Sp1 et p53. La protéine c-myc est modifiée par la O-GlcNAc sur la Thr 58 (Chou *et al.*, 1995). La phosphorylation de la Thr 58 et/ou Ser 62 module la transactivation et la co-transformation par c-myc (Albert *et al.*, 1994; Pulverer *et al.*, 1994). Il existe une réciprocity entre la phosphorylation et la GlcNAcylation au niveau d'un acide aminé (Thr 58), pouvant donc moduler les fonctions de la protéine c-Myc.

La protéine p53 est un facteur de transcription qui se fixe de manière spécifique sur des régions régulatrices de gènes dont elle contrôle l'expression. L'activation de p53 apparaît lors d'un moment de stress de la cellule (lésions à l'ADN, les défauts de division ou métabolisme cellulaire). La phosphorylation de p53 permet de stabiliser la protéine, consolider les interactions protéines/protéines et d'augmenter ses propriétés de transactivation (Bode & Dong, 2004). Il a été montré également que p53 était modifié O-GlcNAc et que cette forme stabilise la protéine p53 et son activité (Yang *et al.*, 2006).

Sp1, un autre facteur de transcription, est impliqué dans la régulation de la transcription de nombreux gènes domestiques mais est également activé au cours de divers processus comme le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation ou la réponse immunitaire et possède donc de nombreux gènes cibles. L'activité du facteur de transcription Sp1 est régulée de manière cycle-dépendante essentiellement par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation. La Serine 59 a été identifiée comme étant la cible de PP2A, ils ont prouvé que l'état de phosphorylation de ce résidu contrôle l'état de phosphorylation et de O-GlcNAc d'autres résidus. Ces résidus pourraient être localisés dans le domaine de fixation à l'ADN pour empêcher la fixation de Sp1 sur la chromatine condensée au cours de la mitose (Vicart *et al.*, 2006).

Le phénomène de « Yin Yang » est également observé dans le contrôle de la traduction. Le facteur d'initiation de la traduction eIF-2 est un élément très important dans la régulation de la traduction des protéines. La phosphorylation de eIF-2 par des kinases inhibe la synthèse protéique. Une protéine de 67 kDa (nommée p67) s'associant à eIF-2 a été identifiée comme étant modifiée par la O-GlcNAc (Datta *et al.*, 1989), empêchant la

phosphorylation de eIF-2, et donc, ce faisant, prévient de l'inhibition de la traduction. Ce n'est qu'après la déglycosylation de p67 que eIF-2 se dissocie de p67 et peut alors être phosphorylé.

III. d. 2. Les pathologies associées aux MPT

Une des caractéristiques principales des neuropathies est la formation d'agrégats protéiques constitués de protéines mal conformées. Dans la maladie d'Alzheimer, ces agrégats sont appelés « plaques séniles » et sont majoritairement composés du peptide β -amyloïde. La protéine Tau (« Tubulin associated unit ») contrôle l'assemblage, la stabilité et l'orientation des microtubules axonaux. Dans des conditions pathologiques, Tau est hyperphosphorylée ce qui provoque son agrégation. Cette protéine peut être modifiée par la *O*-GlcNAc sur plus de 12 sites (Arnold *et al.*, 1996) et il semble que la balance phosphorylation/*O*-GlcNAc soit au cœur de la régulation de sa fonction. Dans une lignée cellulaire de neuroblastome, l'acide okadaïque (un inhibiteur de phosphatases) provoque une hyperphosphorylation de Tau concomitante à une diminution de sa glycosylation et de son transport nucléaire (Lefebvre *et al.*, 2003).

Les processus de cancérisation résultent majoritairement de pertes de contrôle du cycle cellulaire aboutissant à une prolifération cellulaire anarchique et à l'accumulation de mutations géniques. De nombreuses données suggèrent une implication plus ou moins directe de la GlcNAcylation et de la phosphorylation dans le processus de cancérisation. La protéine c-Myc, produit du proto-oncogène c-myc, est une phosphoprotéine nucléaire jouant un rôle critique dans la régulation génique de cellules normales et néoplasiques. Des mutations de c-myc sont associées à différents types de tumeurs (Kato & Dang, 1992). La glycosylation et la phosphorylation de c-Myc sont exclusives au niveau du même site, la thréonine 58, celui-ci étant impliqué dans le lymphome de Burkitt (Chou *et al.*, 1995). La protéine p53 (Shaw *et al.*, 1996) permet de bloquer transitoirement, dans une cellule « normale », la division cellulaire au stage G1 lorsque le génome est altéré. C'est la pause réparatrice, permettant à l'ADN d'être réparé, avant que la cellule ne se divise à nouveau ; si l'ADN n'est pas réparable, la cellule est conduite en apoptose. La protéine p53 est retrouvée mutée dans plus de 60 % des cancers. De façon générale, il a été trouvé dans les tissus cancéreux un degré de phosphorylation de p53 nettement supérieur à celui détecté dans les tissus normaux. Les tumeurs portant une mutation sur p53 étaient hyperphosphorylées sur la Ser15, et la Thr81 qui sont des résidus important dans le fonctionnement de la protéine (Bode & Dong, 2004). La p53 a également été trouvée modifiée par la *O*-GlcNAc qui stabilise p53 (Yang *et al.*, 2006).

III. d. 3. La GlcNAcylation associée à l'olfaction.

Les protéines appartenant à la famille des OBPs sont des protéines sécrétées et qui empruntent la voie du RER, l'appareil de golgi et les vésicules de sécrétion. L'une de ces protéines, la SAL, chez l'espèce porcine a été caractérisée avec une N-glycosylation sur l'Asn 53. Récemment, une étude a montré la présence également d'une GlcNAcylation sur une autre protéine de cette famille, la VEG (Le Danvic *et al.*, 2009). Dans l'OVN, deux isoformes de VEG (VEG1 et VEG2) ont été identifiées et cette étude a mis en évidence la présence de la modification *O*-GlcNAc sur la VEG1. De plus, la présence de cette modification permet à la protéine modifiée d'avoir une spécificité de liaison envers les stéroïdes (la testostérone) tandis que la VEG2 non modifiée se lie préférentiellement envers les acides gras. Le résultat est surprenant car la GlcNAcylation des protéines est décrite comme une modification nucléaire et cytosolique (Torres & Hart., 1984) et aucune littérature ne décrit la présence de cette modification dans la voie de sécrétion des protéines. Des protéines extracellulaires ont été mises en évidence possédant des phosphorylations via des ectokinases (Nath *et al.*, 2008) mais aucune protéine extracellulaire n'a été décrite comme modifiée par la *O*-GlcNAc. Jusqu'à ce travail, l'identification et le rôle fonctionnel des modifications post-traductionnelles sur les propriétés de liaison des OBPs n'a pas été étudié. Or, si la GlcNAcylation génère deux isoformes de VEG avec des propriétés différentes, il se peut que des phosphorylations y soient associées. Ainsi, la présence de modifications post-traductionnelles (GlcNAcylation et phosphorylation) pourrait être responsable d'une diversité au sein des OBPs dont chaque isoforme aurait des spécificités de liaison vis à vis des ligands odorants, permettant d'élargir le rôle de ces protéines. L'identification de ces PTM et leur rôle dans l'interaction des OBPs avec leurs ligands sont décrits dans la suite de ce mémoire.

CHAPITRE 1 : Etude des relations structure/fonction de l'OBP porcine recombinante

I. Contexte et objectifs

Les travaux de l'équipe "Glycobiologie de l'olfaction" ont pour objectif de démontrer que les OBP ne sont pas de simples transporteurs passifs des molécules odorantes ou phéromonales, mais contribuent, par leur spécificité de liaison, à leur codage périphérique, avant l'interaction avec le récepteur olfactif. Dans cette hypothèse, la liaison du ligand odorant doit induire un changement de conformation de la protéine, qui lui confère la possibilité d'interagir avec le récepteur. Ce type de changement de conformation est recherché depuis l'établissement de la structure cristallographique de l'OBP porcine (Spinelli *et al.*, 1998; PDB 1E02). La protéine dans le cristal est sous forme dimérique, les deux monomères étant associés par des interactions hydrophobes faibles. Les deux monomères sont en contact de façon asymétrique et la surface de contact ne représente que 2,6% de la surface totale du dimère, ce qui n'est pas suffisant pour assurer sa stabilité (Spinelli *et al.*, 1998). Dans les conditions physiologiques, il semble que l'OBP soit monomérique à pH acide et dimérique à pH 7.2 (Burova *et al.*, 1999). La cavité interne est tapissée des chaînes latérales de résidus hydrophobes et aromatiques, qui sont conservés entre espèces (Spinelli *et al.*, 1998). La structure tridimensionnelle ne renseigne pas, par contre, sur l'implication de tel ou tel acide aminé dans, d'une part, l'interaction avec le ligand au sein de la cavité hydrophobe, ou d'autre part, l'interaction avec le récepteur.

Ainsi, des études de dynamique moléculaire ont permis, par le calcul, de démontrer que la cavité hydrophobe n'est pas en contact avec le solvant, et que son ouverture est conditionnée par le changement de conformation de résidus qui sont situés de part et d'autre de l'ouverture, constituant une sorte de "porte" (Golebiowski *et al.*, 2006; Golebiowski *et al.*, 2007). Si l'implication de la tyrosine 82 a été mise en évidence à la fois par cristallographie (Spinelli *et al.*, 1998) et par dynamique moléculaire (Hajjar *et al.*, 2006; Golebiowski *et al.*, 2007), l'implication d'autres résidus aromatiques (Phe 35, Phe 55 et Phe 66) ou de Pro 34 est moins claire. L'identification des résidus impliqués dans l'ouverture de la poche hydrophobe, et donc dans l'entrée et la sortie du ligand, est indispensable pour comprendre le processus de liaison en lui-même. Dans ce but, des études de dynamique moléculaire ont été menées par Gérard Vergoten et Philippe Lagant de l'UMR 8576, en se basant sur la structure de l'OBP porcine co-cristallisée avec l'undécanal (PDB 1E02). Les résidus identifiés ont été mutés, et les protéines sauvages et mutantes ont été produites chez la levure *Pichia pastoris*. Enfin,

leurs propriétés de liaison ont été analysées par spectroscopie de fluorescence, en collaboration avec Jean-Paul Cornard (Professeur à Lille1) de l'UMR 8516 (LASIR).

II. Résultats et discussion

Les études de dynamique moléculaire se sont focalisées sur la sortie du ligand présent dans la poche hydrophobe de la structure cristalline de l'OBP, l'undécanal. Elles montrent que deux résidus sont impliqués, Phe 35 qui contrôle la réorientation du ligand vers la sortie, et Tyr 82 qui en s'orientant vers l'extérieur de la protéine, libère le passage et permet la sortie totale du ligand. En position fermée, la tyrosine bloque la sortie de la poche hydrophobe.

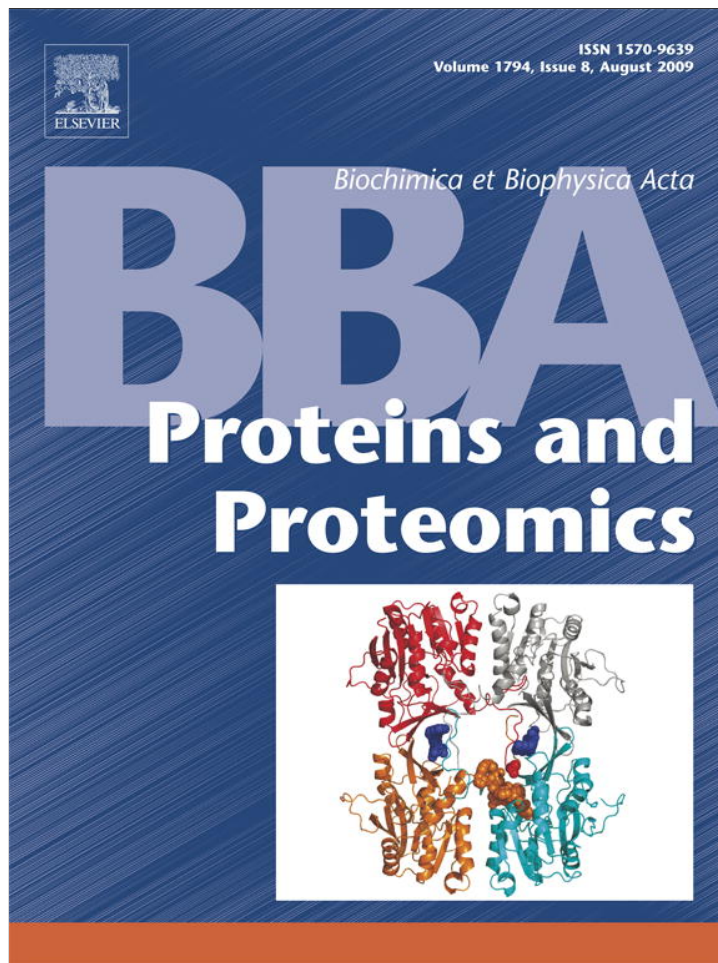
Les résidus Phe 35 et Tyr 82 ont été mutés en Ala par mutagenèse dirigée du plasmide contenant le cDNA codant l'OBP (+Lys 158). La protéine sauvage et trois mutants ont été produits en système hétérologue, la levure *P. pastoris*: l'OBP, l'OBP-F35A, l'OBP-Y82A et l'OBP-F35A/Y82A. Les protéines ont été purifiées du surnageant de culture par FPLC et leur intégrité a été vérifiée par cartographie peptidique et par SDS-PAGE. Leurs propriétés de liaison vis à vis de la sonde fluorescente 1-aminoanthracène ont été suivies par spectroscopie de fluorescence. Dans un premier temps, les caractéristiques spectrales de l'OBP ont été analysées, puis la titration de l'OBP sauvage avec l'1-AMA a été mesurée. La constante de dissociation (K_d) de 0.55 μM reflète une bien meilleure affinité de l'OBP produite en *P. pastoris* pour l'1-AMA que l'OBP native purifiée ($K_d=1.3 \mu\text{M}$, Paolini *et al.*, 1999) ou l'OBP recombinante produite en *E. coli* ($K_d=1.6 \mu\text{M}$, Wei *et al.*, 2008). Par contre, aucune liaison n'a été observée entre l'1-AMA et les trois OBP mutantes, indiquant que l'un et l'autre des deux acides aminés mutés sont essentiels pour que l'1-AMA puisse entrer dans la poche de liaison. Ces travaux constituent la première validation expérimentale de l'implication de la phenylalanine 35 et de la tyrosine 82 dans l'entrée du ligand. Etant donné que les expériences de compétition (déplacement) entre l'1-AMA et des ligands spécifiques n'ont pu être réalisées, nous avons émis l'hypothèse, confirmée par la dynamique moléculaire, que ces deux résidus sont également essentiels à la sortie du ligand.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante:

Nagnan-Le Meillour P., Lagant P., Cornard J. P., Brimau F., Le Danvic C., Vergoten G. & Michalski J. C. (2009a) 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.

Ma contribution à ce travail collectif a consisté à produire les OBP recombinantes en levure *P. pastoris* à partir des plasmides construits au laboratoire, à les purifier et à en effectuer la cartographie peptidique. Je me suis formée à la spectroscopie de fluorescence auprès du Professeur Jean-Paul Cornard et ai réalisé les test de liaison. J'ai effectué la mise en forme des tableaux et des figures correspondants pour la publication.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap

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 odorants 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'-GCGCCCTACGTAATGAAGAGTCTGCTGCTGAGTCTG-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'-GCTACGCATGAAAACCTGGGGGGTGCAATTTCTCC-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'-CAAATTTGTTGTACCTGCGGCGTTAA-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 *SacI* 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 μ L 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 μ L 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 χ_2^{CACBCGD1} , χ_2^{CACBCGD2} (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

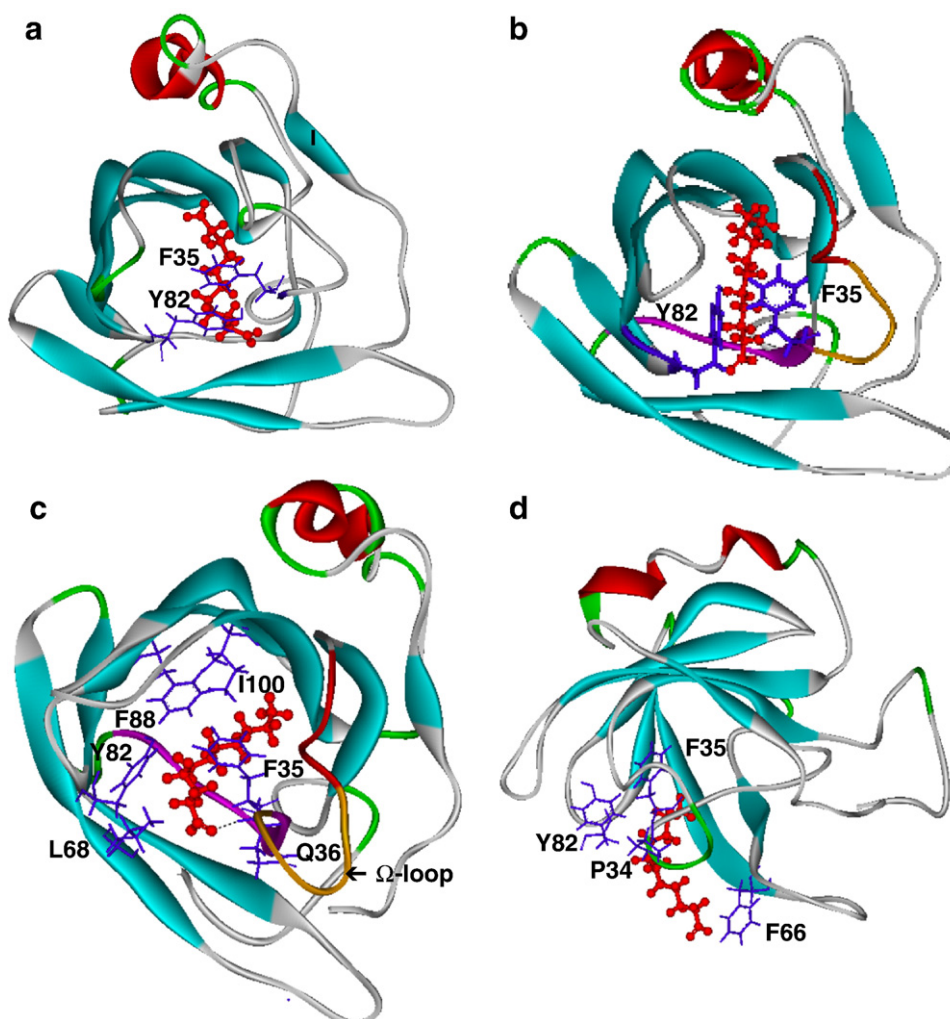


Fig. 1. Unbinding pathway of UND ligand from pOBP. (a) Conformer of pOBP–UND complex obtained after 7.7 ns of a MD run with unrotated side chains of Phe35 and Tyr82 residues. (b) Initial conformer ($t=0$) for the rotated side chains Phe35 and Tyr82 of the pOBP–UND complex. The small helix (residues 25–29) 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

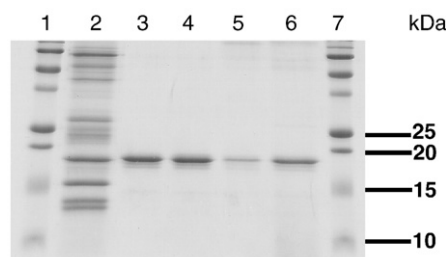


Fig. 2. Biochemical characterisation of native and recombinant pOBP. SDS-PAGE, 1: molecular weight markers (Precision Plus Protein All Blue, BIO-RAD), 2: female respiratory mucosa extract, 3: recombinant wild type pOBP (5 μg), 4: recombinant pOBP-F35A/Y82A (5 μg), 5: recombinant pOBP-F35A (3 μg), 6: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

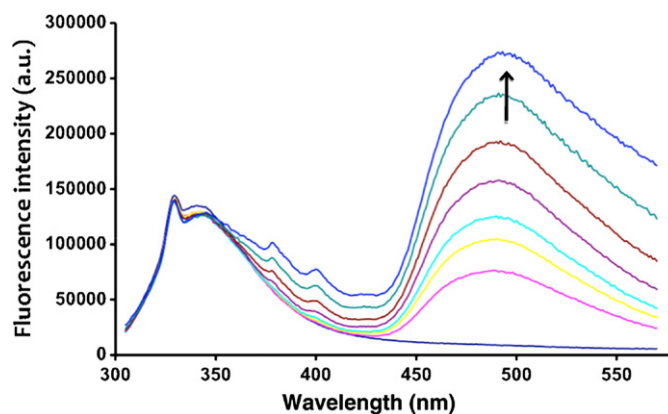


Fig. 3. Titration of a solution of 5 μM recombinant wild type pOBP with increasing concentrations of AMA: 0–0.25–0.5–1–2.5–5–10–15 μM in Tris buffer, pH 7.8 (λ_{ex} = 295 nm, without polarizer).

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

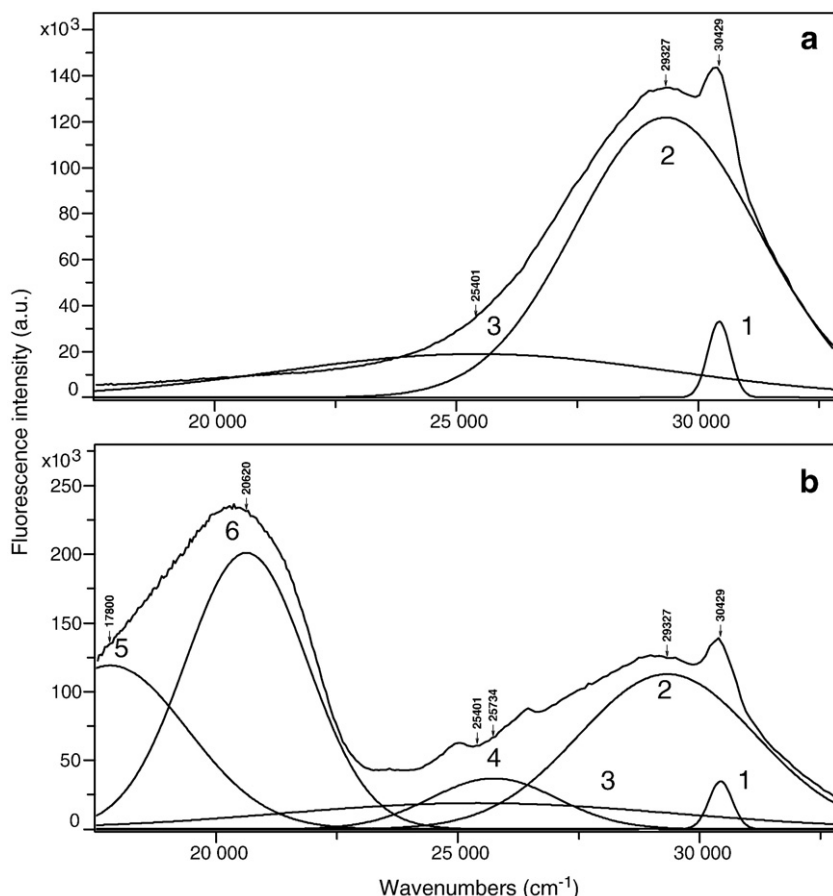


Fig. 4. Spectral decomposition of emission spectrum of recombinant wild type pOBP 5 μM (a), and pOBP 5 μM + AMA 10 μM (b), in Tris buffer. ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm, without polarizer). Band 1 is the Raman band of water; 2 and 3 are protein emission bands, 5 and 6 are bands relative to AMA, free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

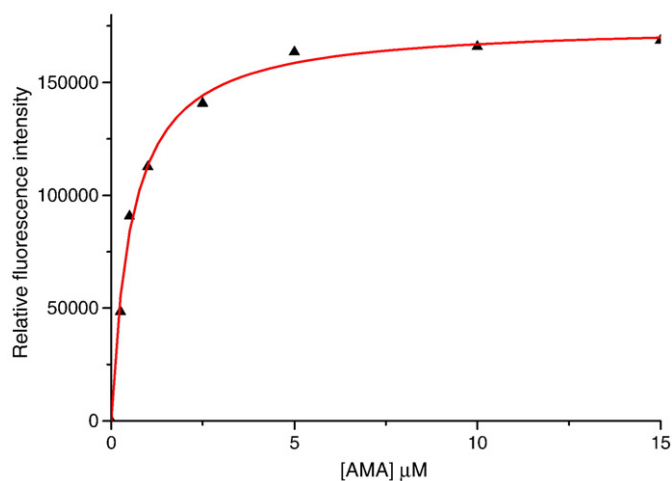


Fig. 5. Binding curve of wild type recombinant pOBP obtained by non-linear least square analysis of the relative fluorescence intensity of AMA band (at 484 nm), as a function of its concentration ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm).

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.

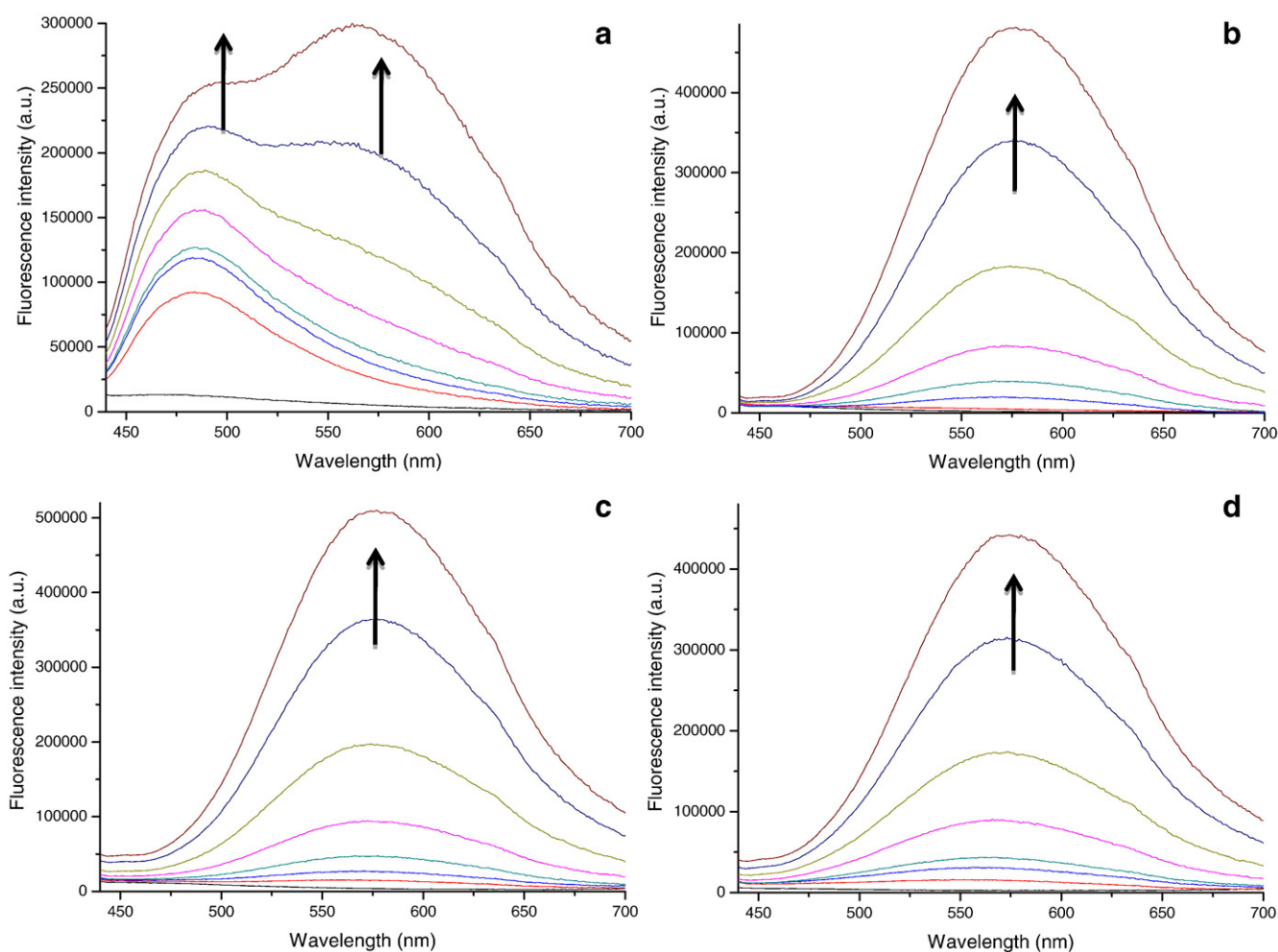


Fig. 6. Titration of a solution of $5 \mu\text{M}$ pOBP (a) pOBP-F35A (b), pOBP-Y82A (c) and pOBP-F35A/Y82A (d) with increasing concentrations of AMA: 0–0.25–0.5–1–2.5–5–10–15 μM in Tris buffer, pH 7.8 ($\lambda_{\text{ex}} = 375$, with polarizers in both excitation and emission beams).

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. Bonice, 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 C63A/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.

CHAPITRE 2 : Identification et localisation des phosphorylations de l'OBP et de la VEG de la muqueuse respiratoire de porcelet

I. Contexte et objectifs

L'hypothèse d'un rôle des OBP dans la discrimination d'odeurs présuppose:

- qu'il existe une diversité de formes d'OBP dans chaque espèce,
- que ces formes ont des propriétés de liaison différentes et spécifiques pour des ligands odorants de natures chimiques différentes.

Dès la première caractérisation de l'OBP porcine, Pelosi et coll. (Paolini *et al.*, 1998) mentionnent la présence, dans les extraits de tissu olfactif, de plusieurs formes. L'OBP étudiée depuis représente la forme majoritaire de cette protéine. Les études ultérieures, y compris l'établissement de la structure tridimensionnelle par cristallographie rayons X (Spinelli *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 2000) seront effectuées soit sur cette forme majoritaire (Burova *et al.*, 1999; Matarazzo *et al.*, 2002; Parisi *et al.*, 2003; Guiraudie *et al.*, 2003; Staiano *et al.*, 2007a; Staiano *et al.*, 2007b; Stepanenko *et al.*, 2008), soit sur l'OBP recombinante produite par la bactérie *E. coli* (Breustedt *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2008). Dans les deux cas, il n'y a pas de diversité de formes d'OBP, surtout dans le cas de la recombinante produite en bactérie. En effet, si des modifications post-traductionnelles existent sur la protéine native, la bactérie ne les positionne pas correctement (NetPhosBac 1.0 *via* www.expasy.org). Ainsi, l'OBP a également été produite chez la levure *P. pastoris* (Guiraudie-Capraz *et al.*, 2005a), qui représente une bonne alternative à l'expression bactérienne, puisque cet eucaryote est capable d'effectuer les modifications post-traductionnelles, y compris la formation adéquate des ponts disulfures. Or, les modifications post-traductionnelles sont génératrices de diversité protéique, d'autant plus lorsqu'elles sont dynamiques comme la phosphorylation et la *O*-N-acétylglucosaminylation. Cette diversité n'a donc pas pu être étudiée jusqu'à présent.

Des expériences préliminaires de western-blot, réalisées au laboratoire, ont montré que l'OBP et la VEG des tissus olfactifs d'animaux pré-pubères peuvent être phosphorylées. En effet, l'OBP et la VEG co-migrent en SDS-PAGE en une seule bande qui est immunoréactive aux trois anticorps spécifiques des acides aminés Ser, Tyr et Thr portant un groupement phosphate. L'objectif de ce travail a été de déterminer si l'une ou l'autre de ces protéines, ou les deux, sont phosphorylées et de localiser leurs sites de phosphorylation par la technique du BEMAD.

II. Résultats et discussion

La bande immunoréactive aux anticorps anti-phosphoserine et anti-phosphotyrosine a été analysée par cartographie peptidique. Les séquences d'OBP et de VEG ne partagent aucun peptide commun après digestion avec la trypsine, ce qui a permis d'obtenir des cartes qui recouvrent à 85% les séquences et de confirmer que les deux protéines co-migrent en SDS-PAGE. Le traitement des échantillons à la phosphatase alcaline réduit considérablement l'immunoréactivité aux anticorps, indiquant que cette réaction est bien due à la présence de groupements phosphates (PO_4) sur le squelette protéique. Par contre, si le signal est significativement diminué, il n'est pas supprimé ce qui suggère que l'efficacité de la phosphatase alcaline n'est pas totale.

La technique du BEMAD (mild **B**eta-**E**limination followed by **M**ichael **A**ddition of **D**TT, d'après Wells *et al.*, 2002b) a été adaptée au laboratoire pour localiser les sites de phosphorylation de l'OBP et de la VEG. Pour l'OBP, onze sites de phosphorylation ont été identifiés, cinq étaient prédits par le logiciel NetPhos (www.expasy.org), il s'agit de Ser 13, Ser 24, Ser 41, Ser 67 et Tyr 82, alors que six autres sites n'étaient pas prédits (Ser 23, Ser 49, Ser 57, Tyr 52, Thr 71 et Thr 122). Pour la VEG, neuf sites ont été localisés sur les Ser 24, 91, 149 et 153, sur les Thr 23, 54 et 151, et sur les Tyr 52 et 87. Malgré l'utilisation combinée de deux enzymes, la trypsine et la chymotrypsine, la position de certains phosphates reste ambiguë. C'est le cas du peptide 59-72 de l'OBP et du peptide 140-157 pour la VEG, pour lesquels plusieurs sites sont potentiellement phosphorylés. Ces ambiguïtés ne pourraient être levées que par mutagenèse dirigée.

Les sites de phosphorylation identifiés correspondent à une image représentative d'un état physiologique de l'animal, si l'on considère que cette modification dynamique est sous contrôle de la perception d'odeurs particulières, à un moment donné. Ceci est reflété par la présence d'un même peptide sous forme phosphorylée ou non, correspondant à des isoformes différentes. Ainsi, en théorie, de nombreuses isoformes d'OBP phosphorylées peuvent coexister ou être générées en réponse à la perception d'odeurs, par l'action de kinases (qui ajoutent le PO_4) ou de phosphatases (qui enlèvent le PO_4).

Ces résultats sont novateurs à plusieurs titres:

- D'abord, ils mettent en évidence l'existence de plusieurs isoformes d'OBP et de VEG qui diffèrent par leurs modifications post-traductionnelles. Jusqu'à présent, seules des isoformes de séquence primaire pouvaient expliquer une certaine diversité de formes d'OBP chez certaines espèces. Le cas le plus remarquable est celui des MUP de souris, chez laquelle une multitude de variants génétiques ont été mis en évidence. Chez le porc, deux variants

génétiques de la VEG ont été identifiés, mais dans des tissus différents, l'un dans la glande de Von Ebner's et l'organe voméronasal (Garibotti *et al.*, 1995; Guiraudie *et al.*, 2003) et l'autre dans la muqueuse respiratoire (Pro141Leu, Scaloni *et al.*, 2001). De même, la SAL présente trois mutations de séquence primaire chez le même individu, mais le nombre de protéines correspondant n'a pas été mis en évidence (Löbel *et al.*, 2000; Scaloni *et al.*, 2001; Guiraudie *et al.*, 2003). Enfin, l'OBP existe sous la forme adulte (Paolini *et al.*, 1998) ou sous la forme juvénile (Guiraudie *et al.*, 2003) en fonction de l'absence ou la présence d'une Lys en position C-terminale. Cependant, aucune différence de propriété de liaison n'a été recherchée pour ces différentes isoformes chez le porc.

- En second lieu, ces résultats démontrent que des protéines sécrétées portent des phosphorylations. Or, des protéines qui empruntent la voie de sécrétion dans le reticulum endoplasmique ne sont pas censées être phosphorylées par les kinases qui sont des enzymes nucléaires et cytoplasmiques. Cependant, des ecto-kinases et ecto-phosphatases ont été découvertes dans le compartiment extracellulaire de plusieurs types cellulaires (Jordan *et al.*, 1994), en particulier des spermatozoïdes où elles régulent la mobilité du sperme (Nath *et al.*, 2008). De telles enzymes pourraient phosphoryler et déphosphoryler l'OBP et la VEG après leur sécrétion dans le mucus nasal.

- En dernier lieu, la phosphorylation, modification post-traductionnelle dynamique, génère en théorie un grand nombre d'isoformes dont les propriétés de liaison peuvent différer. Ainsi, nos résultats permettent de proposer, pour la première fois, un mécanisme de modulation de la spécificité de liaison des OBP. Si ce point était démontré, il étayerait fortement l'hypothèse que la liaison spécifique des OBP avec leur ligand constitue la première étape du mécanisme de transduction olfactive.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante:

Nagnan-Le Meillour P., Le Danvic C., Brimau F., Chemineau P. & Michalski J. C. (2009b) Phosphorylation of native porcine olfactory binding proteins. *J. Chem. Ecol.*, **35**, 752-760.

Ma contribution à ce travail a consisté en l'extraction des protéines à partir des tissus, à effectuer la cartographie peptidique et à localiser les sites de phosphorylation par le BEMAD. J'ai mis en forme les tableaux et les spectres de masse pour la publication.

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 / Published online: 7 July 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 $MgCl_2$ 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

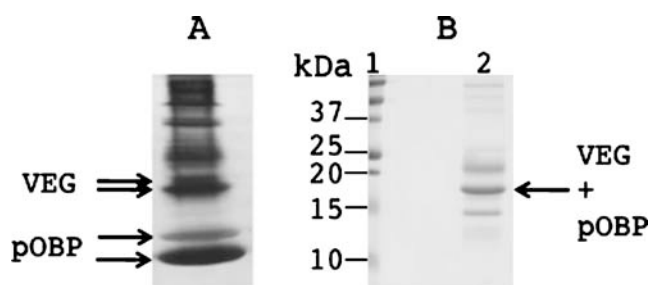
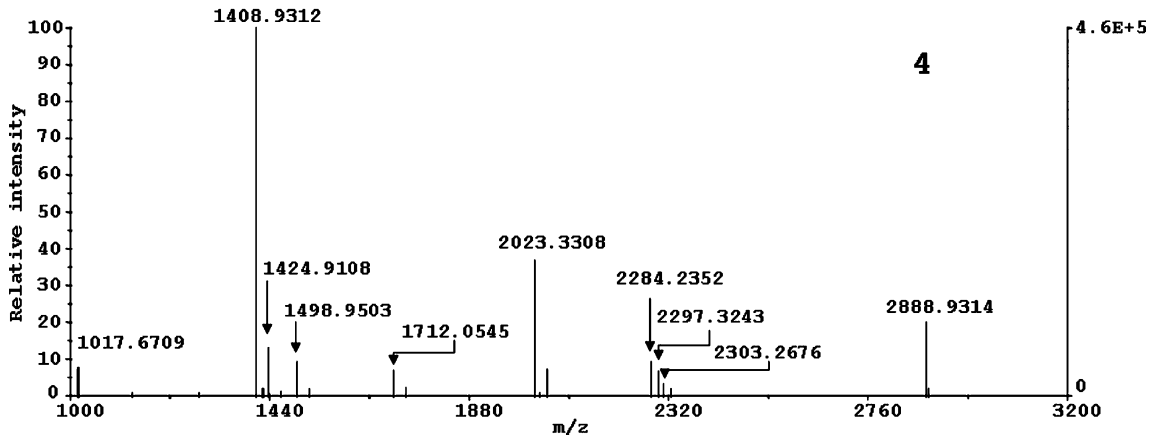
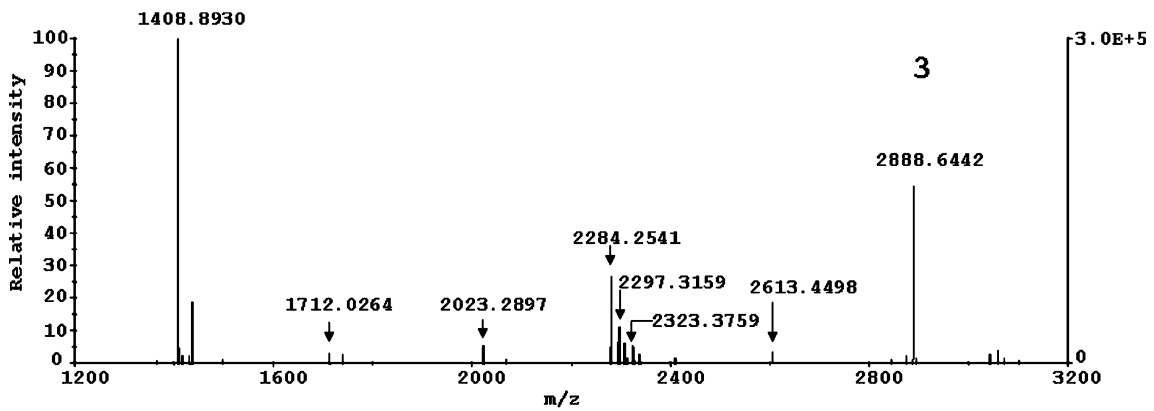
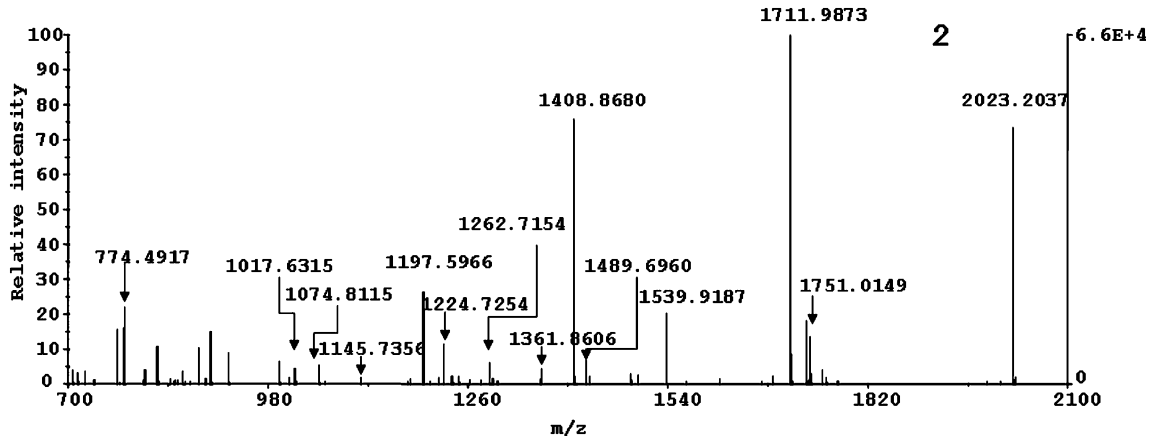
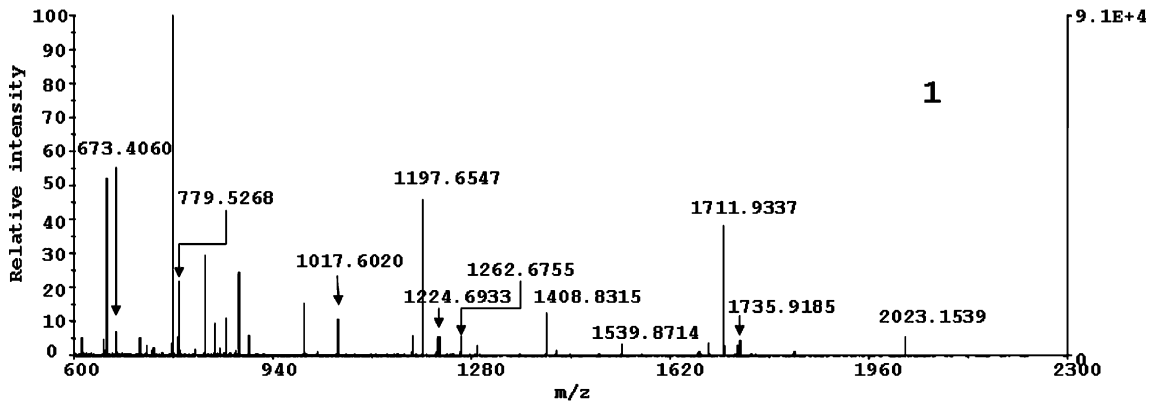


Fig. 1 Separation of protein extracts of pig, *Sus scrofa*, respiratory mucosa (RM) tissue: **A** Native-PAGE and **B** SDS-PAGE. 1: Molecular weight markers in kilodaltons (kDa, Precision plus Protein All Blue, Bio-Rad), 2: RM extract. Coomassie blue staining (16.8% acrylamide). The position of VEG 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

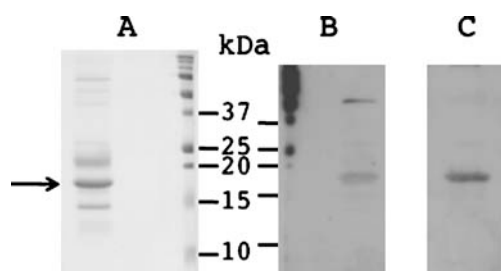


Fig. 3 Immunodetection of phosphorylated proteins in respiratory mucosa (RM) samples of the pig, *Sus scrofa*, by Western blot and ECL Plus detection. **A** Coomassie blue staining of the same sample as used for Western blot analysis. Arrow indicates the band containing pOBP and VEG. **B** antiphosphoserine 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

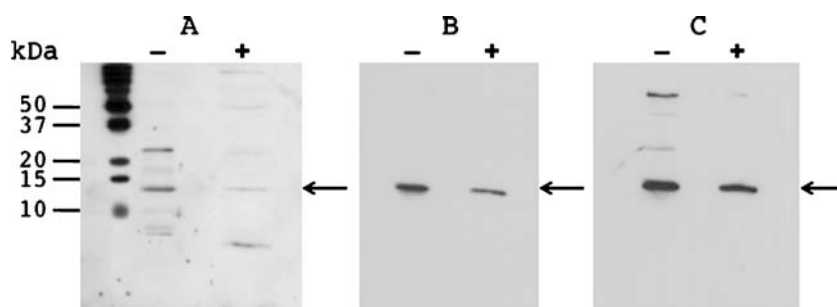


Fig. 4 Analysis of alkaline phosphatase action by Western blot and ECL Plus detection. **A** antiphosphoserine antibodies (1:500 dilution, 2 min exposure). **B** anti-pOBP antibodies (1:20,000 dilution, 15 sec exposure).

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

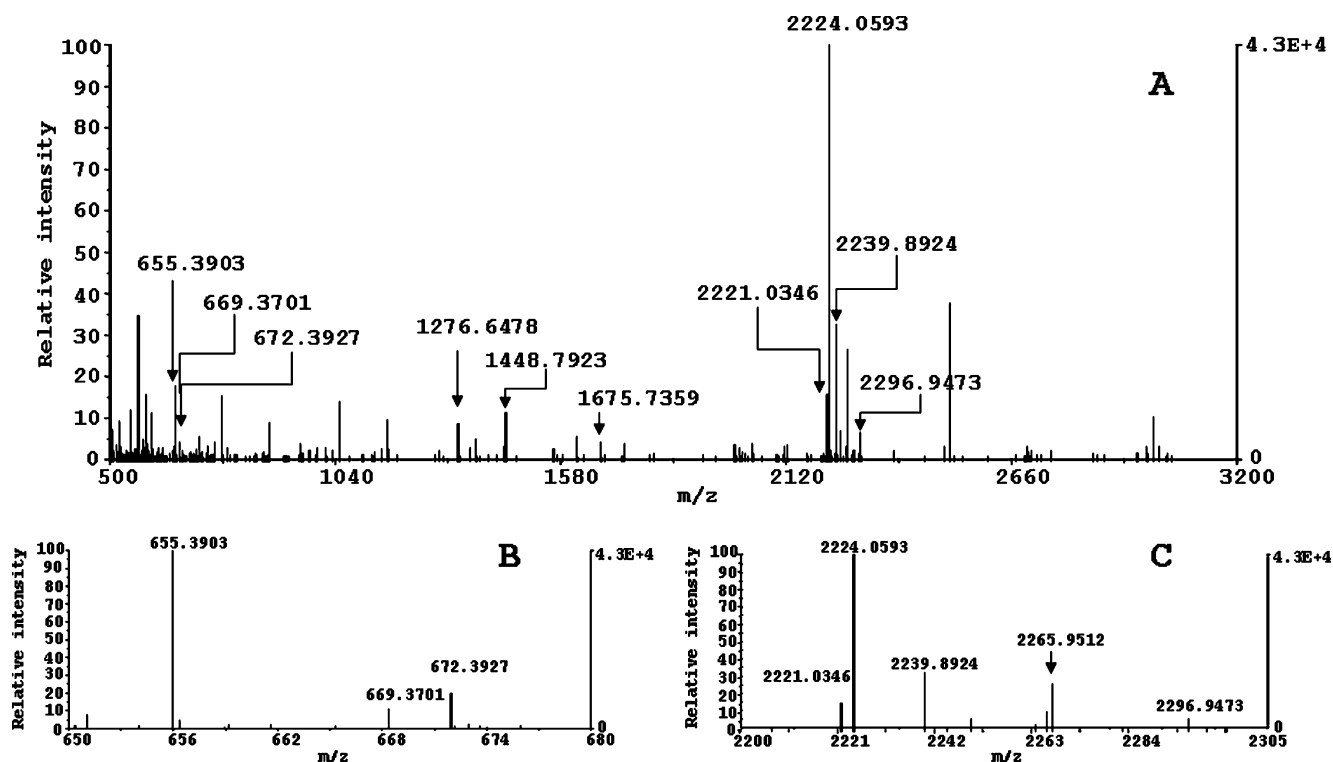


Fig. 5 Monoisotopic mass spectrum of MALDI-TOF MS analysis of carboxymethylated band containing pOBP and VEG (SDS-PAGE) of the pig, *Sus scrofa*, respiratory mucosa (RM) extract after BEMAD. **A** Peptides elution with acetonitrile 50%, after T + CT treatment. **B** Magnification of the 650–680 m/z zone. **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.

CHAPITRE 3 : La spécificité de liaison des isoformes d'Odorant-Binding Protein recombinante est gouvernée par la phosphorylation

I. Contexte et objectifs

La spécificité est la caractéristique principale du système phéromonal, du niveau le plus périphérique jusqu'à l'intégration des signaux odorants dans des zones dédiées du cortex cérébral. Le message lui-même, la phéromone, est d'une grande spécificité, des isomères optiques pouvant avoir des effets comportementaux opposés (attraction, inhibition). Les neurones olfactifs tolèrent une faible différence de structure chimique lorsqu'ils sont stimulés (Kato & Touhara, 2009). Les axones des neurones olfactifs répondant au même composé se projettent vers les mêmes zones du bulbe olfactif, assurant une grande spécificité au système. Il est donc difficile d'imaginer que la seule étape non spécifique serait l'interaction entre le signal phéromonal et les OBP, dans le mucus nasal. C'est pourtant l'hypothèse qui a prévalu pendant deux décennies, mais qui commence à être réfutée par plusieurs données expérimentales. En effet, il semble que les OBP soient impliquées dans la discrimination d'odeurs, en augmentant la sensibilité et la spécificité des récepteurs (Ko *et al.*, 2010), et par leur liaison sélective avec des molécules odorantes par des sous-types de structures primaires différentes (Loëbel *et al.*, 1998; Briand *et al.*, 2000; Tcatchoff *et al.*, 2006).

De plus, nous avons montré dans le chapitre 2 qu'un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation pourrait générer plusieurs isoformes d'OBP et de VEG avec des propriétés de liaison différentes (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b).

Afin de valider cette hypothèse, nous avons entrepris d'étudier la diversité d'isoformes d'OBP porcine sur des modèles cellulaires eucaryotes, la levure *P. pastoris* et la lignée cellulaire CHO (Chinese Hamster Ovaries). En effet, les cellules procaryotes (*E. coli*) ne possèdent pas la machinerie nécessaire à la synthèse de protéines eucaryotes identiques aux protéines natives. Lorsque les modifications post-traductionnelles sont ajoutées, elles peuvent beaucoup différer de celles des protéines natives (Daly & Hearn, 2005). Aussi, nous avons utilisé deux lignées eucaryotes afin d'obtenir des protéines les plus semblables possibles à celles sécrétées par les cellules glandulaires de porc. L'aspect quantitatif nous a également orienté vers les protéines recombinantes. Le but du travail étant *in fine* d'étudier les propriétés de liaison des isoformes en relation avec leur patron de phosphorylation, de grandes quantités de protéines sont nécessaires pour effectuer les mesures par spectroscopie de fluorescence.

II. Résultats et discussion

Les protéines ont donc été produites en *P. pastoris* au laboratoire et en lignée CHO par E. Pajot (INRA, NOeMI). Les études préliminaires sur l'OBP recombinante produite en *P. pastoris* ont montré que la purification par FPLC ne permet d'obtenir qu'un mélange de formes, aussi avons nous utilisé l'HPLC avec une colonne échangeuse d'anions pour séparer les éventuelles isoformes. Ce système permet de séparer des formes protéiques différant par leur charge, ce qui est le cas des isoformes générées par les phosphorylations. Quatre fractions immunoréactives à l'anti-OBP sont éluées à partir du surnageant de culture *P. pastoris*, et une seulement à partir du surnageant de culture CHO. L'intégrité des protéines est vérifiée par cartographie peptidique. La fraction contenant l'OBP produite par les cellules CHO est en trop petite quantité pour effectuer les analyses de modifications post-traductionnelles, de même pour les deux fractions minoritaires produites par la levure. Les deux fractions majoritaires produites par la levure, OBP-iso2 et OBP-iso3, ont été analysées par le BEMAD pour localiser les sites de phosphorylation (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b). Pour les deux isoformes, on retrouve non seulement les onze sites de phosphorylation de la protéine native (mélange d'isoformes, Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b), mais aussi six sites additionnels spécifiques de la production en levure. Ainsi, les cellules de levure semblent hyperphosphoryler les protéines, tout comme elles ajoutent des glycosylations supplémentaires (Daly & Hearn, 2005).

Même si les deux isoformes produites par la levure diffèrent des isoformes natives, nous avons voulu tester leurs propriétés de liaison à l'égard des composés phéromonaux chez le porc (androsténone et androsténol), de certains composants de la SAP (acide palmitique et myristique) et de la testostérone, qui est le ligand spécifique de la VEG et n'est pas lié par l'OBP (Le Danvic *et al.*, 2009). Ce dernier composé constitue donc un témoin négatif pour le test de liaison. Nous avons utilisé l'OBP-Pichia totale (mélange d'isoformes) comme témoin positif. L'objectif de ce test par spectroscopie de fluorescence était de valider l'hypothèse selon laquelle des patrons de phosphorylation différents sont à l'origine de propriétés de liaison différentes. A cette occasion, nous avons pu mettre au point avec Jean-Paul Cornard (LASIR) le test de compétition, qui consiste à déplacer la liaison de la sonde fluorescente 1-AMA avec des quantités croissantes de ligand, la diminution de fluorescence (sortie de l'AMA) permettant de calculer une constante pour cette liaison.

La testostérone n'est liée par aucune des deux isoformes, comme attendu. L'OBP-iso2 a plus d'affinité pour les deux acides gras que pour les stéroïdes, alors que l'OBP-iso3 présente un comportement opposé: plus d'affinité pour les stéroïdes que pour l'acide

myristique, et aucune affinité pour l'acide palmitique qui ne déplace pas la liaison avec l'AMA, quelque soit sa concentration.

Les groupements phosphates ont été localisés sur la structure tridimensionnelle en collaboration avec Philippe Lagant (UGSF), à partir du fichier de données cristallographiques PDB 1E02. Les résidus Ser 23, Ser 24 et Ser 49 sont internes à la cavité et peuvent interagir avec les ligands. Ils sont phosphorylés dans l'OBP-iso3 et non phosphorylés dans l'OBP-iso2. Le résidu Tyr 82, permettant ou non l'accès au site de liaison (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009a), est phosphorylé dans l'OBP-iso3, pas dans l'OBP-iso2, ce qui a apparemment des conséquences importantes sur la liaison avec les ligands. D'autres résidus phosphorylés pointent leur chaîne latérale, et donc leur phosphate vers l'extérieur de la protéine, suggérant des interactions possibles avec d'autres molécules d'OBP ou avec la boucle extracellulaire du récepteur olfactif.

Nos résultats indiquent que:

- Le mécanisme de phosphorylation de protéines sécrétées est commun aux cellules glandulaires de porc (glandes de Bowman), aux cellules de la levure *P. pastoris* et aux cellules ovariennes de la lignée CHO. Le mécanisme correspondant est totalement inconnu et mérite d'être étudié ultérieurement. Les différences de phosphorylation générées par les trois types cellulaires peuvent provenir, soit de spécificités dans les enzymes impliquées (plus de Ser/Thr kinase chez la levure), soit de réponses différentes dues aux conditions de culture. Dans le cas des cellules de la glande de Bowman, on peut supposer que la phosphorylation est sous contrôle, non seulement de la perception d'odeurs, mais aussi de l'état physiologique et hormonal de l'animal (pubère/prépubère).

- La phosphorylation gouverne les propriétés de liaison des isoformes recombinantes d'OBP. Les différences d'affinité pour les ligands signifiants d'un point de vue comportemental sont d'un grand intérêt biologique. Il apparaît en effet que des molécules ayant des impacts différents sur le comportement du porc sont codées par des isoformes différentes d'OBP. Les isoformes sont capables de discriminer des molécules différant par une fonction alcool (androsténone et testostérone) ou par un CH₂ de la chaîne carbonée (acide palmitique et acide myristique).

Il est clair que l'OBP ne peut plus être considérée comme un transporteur passif des molécules odorantes ou phéromonales, mais que des isoformes différant par leur patron de phosphorylation effectuent un codage très fin de ces molécules, impliquées dans le comportement reproducteur ou le maintien de la hiérarchie chez le porc.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de la publication suivante:

Brimau F., Cornard J. P., Le Danvic C., Lagant P., Vergoten G., Grebert D., Pajot E. & Nagnan-Le Meillour P. (2010) Binding specificity of recombinant odorant-binding protein isoforms is driven by phosphorylation. *J. Chem. Ecol.*, **36**, 801-813.

Ma contribution à ce travail collectif a été de produire en *P. pastoris* l'OBP porcine, à en purifier les isoformes par HPLC et à en effectuer la caractérisation par cartographie peptidique. J'ai localisé les sites de phosphorylation des différentes protéines produites en cellules de levure et en cellules CHO par le BEMAD. J'ai mis au point avec le Professeur Jean-Paul Cornard les tests de déplacement avec les ligands et mené les expériences. J'ai mis en forme les tableaux (cartographies et BEMAD) et les figures de spectroscopie de fluorescence pour la publication.

Binding Specificity of Recombinant Odorant-Binding Protein Isoforms is Driven by Phosphorylation

Fanny Brimau · Jean-Paul Cornard · Chrystelle Le Danvic · Philippe Lagant · Gerard Vergoten · Denise Grebert · Edith Pajot · Patricia Nagnan-Le Meillour

Received: 30 March 2010 / Revised: 4 June 2010 / Accepted: 11 June 2010 / Published online: 30 June 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Native porcine odorant-binding protein (OBP) bears eleven sites of phosphorylation, which are not always occupied in the molecular population, suggesting that different isoforms could co-exist in animal tissues. As phosphorylation is a dynamic process resulting in temporary conformational changes that regulate the function of target proteins, we investigated the possibility that OBP isoforms could display different binding affinities to biologically relevant ligands. The availability of recombinant proteins is of particular interest for the study of protein/ligand structure-function relationships, but prokaryotic expression systems do not perform eukaryotic post-translational modifications. To investigate the role of phosphorylation in the binding capacities of OBP isoforms, we produced recombinant porcine OBP in two eukaryotic systems, the yeast, *Pichia pastoris*, and the mammalian CHO cell line. Isoforms were separated by anion exchange HPLC, and their phosphorylation sites were mapped by MALDI-TOF mass spectrometry

and compared to those of the native protein. Binding experiments with ligands of biological relevance in the pig, *Sus scrofa*, were performed by fluorescence spectroscopy on two isoforms of recombinant OBP expressed in the yeast. The two isoforms, differing only by their phosphorylation pattern, displayed different binding properties, suggesting that binding specificity is driven by phosphorylation.

Key Words Anion exchange HPLC · Fluorescence spectroscopy · Heterologous expression · Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry · Odorant-binding protein · Peptide mapping · Pheromone · Phosphorylation · Polymerase chain reaction (PCR) · Recombinant protein · Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) · *Sus scrofa* · Western blotting

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10886-010-9820-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

F. Brimau · C. Le Danvic · P. Nagnan-Le Meillour (✉)
INRA, UMR8576 CNRS/USTL, UGSE,
59655 Villeneuve d'Ascq, France
e-mail: patricia.le-meillour@univ-lille1.fr

J.-P. Cornard
UMR8516 CNRS/USTL, LASIR,
59655 Villeneuve d'Ascq, France

P. Lagant · G. Vergoten
CNRS, UMR8576 CNRS/USTL, UGSE,
59655 Villeneuve d'Ascq, France

D. Grebert · E. Pajot
INRA, UR1197 NOeMI,
78350 Jouy-en-Josas, France

Introduction

The pheromonal system in mammals is considered to be sensitive and specific (Tirindelli et al. 2009), requiring specific interactions between the molecular elements involved at every step of the detection and integration pathways (Brennan and Kendrick 2006). The first level of specificity is ensured by the nature of the pheromone itself: Its composition is stable within a species, both quantitatively and qualitatively. Integration of the signal from its reception by sensory organs to the data processing by the brain is highly specific (Brennan and Kendrick 2006). The olfactory receptors are also specific. They have only a small tolerance for changes in size or branching of ligand analogs (Buck 2004; Kato and Touhara 2009).

One step where the specificity is not clear is at the peripheral level of pheromone reception, in particular the

role of odorant-binding proteins (OBP) in olfactory transduction. These soluble proteins are secreted by specialized glands in the vicinity of olfactory neurons and function at least as vehicles of odors and pheromone component molecules, but a more specific role in their binding was suggested when they were discovered (Pelosi et al. 1982). Arguing against the specificity of OBP is their low diversity in each animal species, and their broad binding spectrum to molecules of different chemical structures (Pelosi 1996, 2001). In the last decade, structural studies [X-ray crystallography (Spinelli et al. 1998; Vincent et al. 2000), fluorescence spectroscopy (Paolini et al. 1999), and isothermal calorimetry (Burova et al. 1999)] were conducted on model OBPs (bovine, porcine), which were obtained by purification of the major form from nasal tissue. Alternatively, recombinant proteins were produced in high yields by overexpression in organisms such as bacteria and yeast (Parisi et al. 2005; Wei et al. 2008; Nagnan-Le Meillour et al. 2009a). These cells, however, display different metabolic pathways from mammalian cells, and the corresponding recombinant proteins do not always resemble their native counterparts. In particular, post-translational modifications (PTM) such as disulfide bridge formation, glycosylation, or phosphorylation, if present, can differ strongly from that obtained in mammalian cells (Narhi et al. 1991; Daly and Hearn 2005).

There is growing evidence that OBPs are involved in the first step of odorant discrimination by 1) enhancing receptor sensitivity and specificity (Ko and Park 2008; Vidic et al. 2008; Ko et al. 2010), and/or 2) selectively binding odorant molecules of various chemical structure by sub-types differing in their primary sequence (Loëbel et al. 1998; Briand et al. 2000; Teatchoff et al. 2006). In addition, we demonstrated recently that a dynamic mechanism involving PTM could be responsible for OBP diversity and specificity (Le Danvic et al. 2009; Nagnan-Le Meillour et al. 2009b). Indeed, porcine OBP can be posttranslationally modified by phosphorylation, and we suggested that this PTM could generate a diversity of OBP isoforms with specific binding properties (Nagnan-Le Meillour et al. 2009b). PTM is known to regulate signalling pathways, and phosphorylation could be a mechanism of regulation of OBP specificity towards odorant ligands. To investigate further the binding specificity of potential phosphorylated isoforms, we undertook the production of recombinant OBP in two different eukaryotic systems, the yeast, *Pichia pastoris*, which successfully expresses high yields of secreted OBP, and a mammalian cell line, CHO (Chinese Hamster Ovary), the metabolic pathways of which could be close to those of pig, *Sus scrofa*, glandular cells. Our goal was to validate the use of recombinant proteins to study further the role of phosphorylation in OBP binding to pheromone components. We purified OBP isoforms by

anion-exchange HPLC and we mapped their phosphorylation sites, which were compared with those previously characterized in the native form of OBP (Nagnan-Le Meillour et al. 2009b). Binding experiments with ligands of biological relevance to *S. scrofa* (male and female pheromones) were conducted by a fluorescent probe displacement assay on two isoforms of recombinant OBP expressed in the yeast. The two isoforms, differing only by their phosphorylation pattern, displayed different binding properties, suggesting that this binding specificity is indeed driven by phosphorylation.

Methods and Materials

Expression of Recombinant OBP in Yeast (OBP-Pichia)

The recombinant porcine odorant binding protein (OBP) was expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* (GS 115 strain) and purified as previously described (Nagnan-Le Meillour et al. 2009a). After a ten-fold concentration (Vivaspin 20, 3000 MWCO, Sartorius, Palaiseau, France) and extensive dialysis against water, the culture supernatant was dried under vacuum (Eppendorf, Le Pecq, France) and stored at -20°C before purification.

Expression of Recombinant OBP in CHO cells (OBP-CHO)

The cDNA sequence encoding OBP (GenBank accession number AF436848) was amplified by PCR from the *OBP/pPIC3.5K* plasmid used for expression in yeast, with the following primers: sense 5'-**CACC**ATGAA GAGTCTGCTGCTGAGT-3' and antisense 5'-TCACTTGGCAGGACAGTCATCTCT-3'. The sense primer contains the CACC bases (in bold) allowing directional cloning into the *pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO[®]* vector of the *pcDNATM3.1 Directional TOPO Expression kit* (Invitrogen, Paisley, UK), followed by codons of the natural signal peptide of the protein (underlined). PCR amplification was carried out on a Thermal Cycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) with 100 ng of cDNA template in a solution containing 1.25 U of Hot Start Proofreading DNA polymerase (Accu PrimeTM Pfx, Invitrogen), 0.3 μM of each PCR primer, and 1 X 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 sec at 95°C , 30 sec at 60°C , and 1 min at 68°C . The single PCR product obtained was ligated into the *pcDNA3.1d* expression vector according to the manufacturer's instructions. The plasmid DNA was amplified into One Shot[®] Top10 chemically competent cells (Invitrogen). After purification (QIAprep Spin Miniprep kit, QIAGEN, Courtaboeuf, France), the *OBP/pcDNATM3.1D* plasmid was sequenced in both senses (Genoscreen, Lille, France).

CHO-K1 cells (Chinese Hamster Ovary, clone K1) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM F-12, Gibco BRL, Invitrogen) containing 10% non supplemented fetal bovine serum (FBS, Perbio, Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France) in a 5% (v:v) CO₂ atmosphere at 37°C. Cells were transfected with 3 µg of *OBP/pcDNATM3.1D* at a 50% confluence by using ExGen500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) in culture dishes. The supernatant medium was collected 48 hr after transfection.

Protein Purification Purification of recombinant proteins was achieved by high-resolution anion exchange liquid chromatography on a DIONEX HPLC device (Voisins-le-Bretonneux, France). Proteins were separated on a PROPAC PA1 column (4×250 mm), in 50 mM Tris/HCl, pH 6.0 (buffer A), by using a linear gradient of 0–1 M NaCl at a flow rate of 0.8 ml/min. Typically, samples of 500 µl in buffer A were injected, and resulting fractions were collected and extensively dialyzed against MilliQ water. OBP isoforms were identified in HPLC fractions by Western blot with anti-OBP antibodies (Nagnan-Le Meillour et al. 2009b). Their identity was confirmed by peptide mapping, followed by MALDI-TOF mass spectrometry as already described (Nagnan-Le Meillour et al. 2009b). A part of the recombinant OBP-Pichia was purified by FPLC (Nagnan-Le Meillour et al. 2009a), which does not separate the different isoforms (total OBP-Pichia). Recombinant proteins were quantified with the Micro BCA Protein Assay kit (PIERCE, Thermo Fischer Scientific).

Immunodetection of Phosphorylations with Specific Antibodies HPLC fractions (OBP-Pichia and OBP-CHO) and total OBP-Pichia were suspended in sample buffer, to be separated by SDS-PAGE (Nagnan-Le Meillour et al. 2009a). An aliquot of crude nasal tissue extract (Nagnan-Le Meillour et al. 2009b) was added as a migration control of OBP, together with molecular weight markers (Precision Plus Protein All Blue, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Western blots with specific antibodies directed against phosphoserine, phosphotyrosine, and phosphothreonine (Invitrogen, Paysley, UK) were performed exactly as described in Nagnan-Le Meillour et al. (2009b). Detection of signal was carried out with an ECL Plus Western Blotting Detection kit (GE Healthcare, Orsay, France).

Mapping Phosphorylation Sites in Recombinant OBPs The sites of phosphorylation in recombinant OBP isoforms and total OBP-Pichia were determined by the BEMAD (Beta-Elimination followed by Michael Addition of DTT) method followed by MALDI-TOF MS analysis, fully described for total native OBP from pig nasal tissue in Nagnan-Le

Meillour et al. (2009b). Briefly, total proteins and isoforms purified by HPLC were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue R solution. Band slices were treated with trypsin (T) and/or chymotrypsin (CT) without alkylation and reduction to generate specific peptides. Peptides then were incubated with alkaline phosphatase to remove phosphate groups prior to the linkage of DTT (dithiothreitol, Sigma-Aldrich, La Verpillière, France) by Michael addition. After a step of enrichment of DTT-modified peptides by using thiol columns, peptides were eluted directly into the matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, Sigma-Aldrich, La Verpillière, France) with 25 and 50% acetonitrile (Nagnan-Le Meillour et al. 2009b), and analyzed by MALDI-TOF MS. The theoretical masses of DTT-modified peptides were calculated from the OBP peptide map (NP_998961) by using the peptide-mass software at [www://expasy.org/tools/peptide-mass.html](http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html).

Position of the Phosphate Groups in the Three-dimensional Structure of Porcine OBP Phosphate groups were added to the residues that could undergo phosphorylation in the OBP sequence. We used the complete set of atomic coordinates available for the non-phosphorylated OBP (PDB identifier 1E02) obtained after addition of the first eight N-terminal and the Lys158 C-terminal residues to the crystal structure obtained by Vincent et al. (2000) according to the method described in a previous work (Nagnan-Le Meillour et al. 2009a). We used the CHARMM program (McKerell et al. 1998) with the possibility of adding phosphated pre-residues, and by using a homemade program, the related Cartesian coordinates for the phosphate groups (mono-anionic) could be determined easily. Images were created with the MacPyMOLTM software.

Binding Assay Studies using Fluorescence Spectroscopy Androstenone (3-keto-5 α -16-androstene), androstenol (3 α -hydroxy-5 α -androst-16-ene), testosterone (17 β -hydroxy-3-oxo-4-androstene), palmitic acid (hexadecanoic acid), myristic acid (tetradecanoic acid), and AMA (1-aminoanthracene) were purchased from Sigma-Aldrich (La Verpillière, France).

UV-visible spectra were recorded on a double beam spectrometer (Cary-100 Varian, Les Ullis, France) with a cell of 0.5 cm path length. The protein concentration was calculated by UV-visible spectroscopy, by using the molar extinction coefficient of 11740/M•cm for OBP (calculated by the software "ProtParam tool" at www.expasy.org) at the maximum of absorption (280 nm). Fluorescence measurements were performed on a Fluoromax-3 (Jobin-Yvon, Longjumeau, France) spectrofluorimeter at 22°C with semi-micro quartz cell (0.5 cm light-path) with reflecting window. The steady-state fluorescence spectra were recorded at 0.5 nm intervals with an integration time of 1 sec. The solution absorbance was <0.1 at the excitation

wavelength, to avoid inner filter effects. The fluorescent probe AMA was dissolved in 100% ethanol as 1 mM stock solution. For protein titration, aliquots of AMA were successively added to the protein at 2.5 μM in 50 mM Tris buffer (pH 7.8), and emission spectra were acquired after a 15 min equilibration period. All solutions were excited at 295 nm, which corresponds to the protein absorption band, where the absorption of the Trp16 residue is much higher than that of tyrosines (Lakowitz 1999). Emission spectra were recorded without Glan-Thompson polarizers in the excitation and detection channels. The excitation and emission bandwidths were set to 3 nm. The spectra were recorded 3 times and averaged to increase the signal-to-noise ratio. Before data analysis, the spectra were normalized by taking the Raman line of water as reference. In order to obtain real intensities of the emission bands of free AMA and probe in interaction in the OBP pocket, a 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 wave numbers.

The dissociation constant ($K_{\text{d-AMA}}$) of the OBP-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 affinity of the five ligands was measured in competitive binding assays, using AMA as the fluorescent probe at a 3.75 μM concentration, whereas the competitor ligand concentration varied from 0 to 15 μM . The spectra were recorded 15 min after the ligand addition, and the competition was monitored by following the fluorescence intensity decrease of the band of AMA bound to the protein. The apparent K_{d} values of the ligand-protein systems were calculated according to $K_{\text{d}} = [\text{IC}_{50}]/(1 + [\text{AMA}])$ where $[\text{IC}_{50}]$ is the competitor concentration that yields a fluorescence decay of 50% of the protein-AMA complex.

Results and Discussion

Isoform Purification and Identification As phosphorylation could confer different global charges to isoforms, we used strong anion exchange chromatography with a linear gradient of NaCl for their purification. Isoforms of OBP-Pichia and OBP-CHO were obtained by HPLC purification (Fig. 1). The eluted fractions were collected manually and were extensively dialyzed against water. Fractions were dried under vacuum and suspended in sample buffer to be analyzed by SDS-PAGE (Fig. 2a) and by western blot with anti-OBP antibodies (Fig. 2b). For OBP-Pichia, four peaks (Fig. 1a) were immunodetected with anti-OBP antibodies (Fig. 2b), but only two (peak 2 = OBP-Pichia-iso2 and peak

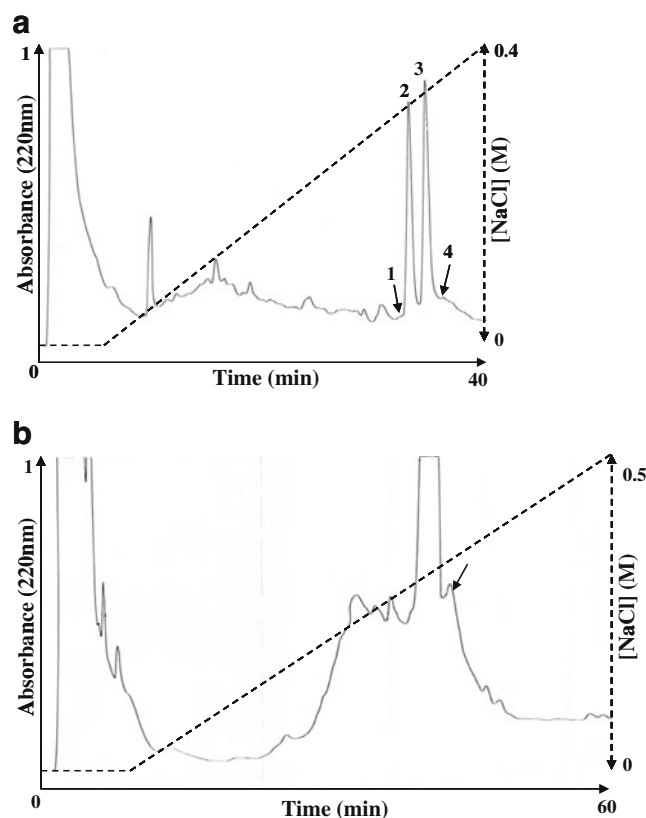


Fig. 1 Purification of recombinant *Sus scrofa* OBP isoforms by anion exchange HPLC. Dotted lines represent the linear gradient of NaCl. **a** Chromatogram of OBP-Pichia purification (peaks 1 to 4 contain protein immunoreactive to anti-OBP antibodies). **b** Chromatogram of OBP-CHO purification (the arrow indicates the protein that is immunoreactive to anti-OBP antibodies)

3 = OBP-Pichia-iso3) were in sufficient quantity (135 μg per run) to perform further analysis. They were eluted at 0.31 M and 0.32 M NaCl respectively that reflects slightly different charges.

The purification of OBP-CHO allowed separating the protein from other elements of the DMEM medium (in particular BSA in large amounts in FBS), but only one peak eluted at 0.26 M NaCl was immunopositive to anti-OBP antibodies (Figs. 1b and 2b).

Peptide mapping analysis was performed on OBP-Pichia isoforms from SDS-PAGE gel (identical to the one in Fig. 2a), giving 70% of peptide recovery for OBP-Pichia-iso2 and 90% for OBP-Pichia-iso3 (data not shown). In comparison, the percentages were 80% for OBP-native and total OBP-Pichia (Nagnan-Le Meillour et al. 2009a). In both cases, the 1–15 peptide of theoretical mass 1711.7810 Da was retrieved, indicating that the signal peptide was properly removed through the secretion pathway, as it was previously observed for OBP-native and total OBP-Pichia (Nagnan-Le Meillour et al. 2009a). As the quantity of purified OBP-CHO isoform was scarce, the identity of the protein was confirmed by BEMAD,

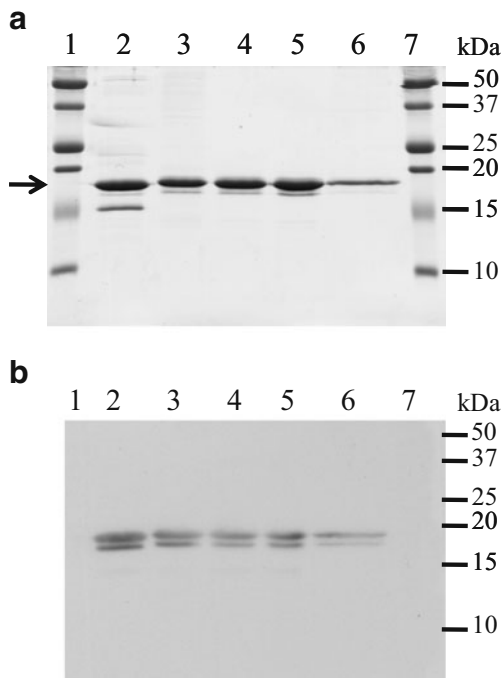


Fig. 2 Identification of recombinant *Sus scrofa* OBP isoforms. **a** SDS-PAGE, Coomassie blue staining. **b** Western blot with anti-OBP antibodies (1:20,000 dilution, ECL Plus detection, 15 sec exposure). (1 and 7) Molecular weight markers (BioRad), (2) crude extract of nasal mucus, (3) total OBP-Pichia, (4) OBP-Pichia-iso2, (5) OBP-Pichia-iso3, (6) OBP-CHO. Note that molecular weight markers are not labeled with specific antibodies (wells 1 and 7)

which gives information on both amino acid sequence and phosphorylation sites with a single sample.

Immunodetection of Phosphorylation Aliquots containing the same quantity of proteins as above were analyzed by western blot with specific antibodies raised against the three types of phosphorylation. A strong immunoreactivity of all recombinant proteins was observed with the anti-phosphoserine antibody (Fig. 3a, wells 3 to 6), identical to the one of native OBP (Fig. 3a, well 2). In contrast, the signal was weak with anti-phosphotyrosine antibody (Fig. 3b), and no signal was obtained with antiphosphothreonine antibody (Fig. 3c). These results are consistent with those already obtained with native OBP and could reflect the high number of modified serines compared to the two other residues (Nagnan-Le Meillour et al. 2009b).

Mapping of Phosphorylation Sites DTT addition confers a tag of defined molecular mass to peptides bearing phosphate groups: 136.2 Da for one DTT, 272.4 Da for 2 DTT and 408.6 Da for 3 DTT. The measured masses of peptides obtained after BEMAD treatment were compared to the theoretical list of potential DTT-modified peptides calculated from the OBP protein sequence (NP_998961). The BEMAD results are given in Table 1 for OBP-Pichia,

Table 2 for OBP-CHO, Table 3 for OBP-Pichia-iso2, and Table 4 for OBP-Pichia-iso3. The spectra obtained for OBP-Pichia-iso2 and OBP-Pichia-iso3 are provided in Supplementary data. It should be noted that some peptides, unmodified by DTT also were found in the spectra (italicized in Tables), despite the use of thiol columns to enrich the samples in DTT-modified peptides. This was reported previously for the native protein (Nagnan-Le Meillour et al. 2009b) and reflects the fact that each phosphorylated isoform could be in minor quantity compared to non-phosphorylated forms. As phosphorylation is a dynamic process, only a small fraction of the pool of a protein is phosphorylated at a given time as a result of a stimulus. The consequence also is that phosphoproteins are heterogeneous and exist in several phosphorylated forms. Indeed, several forms of one peptide were observed for each recombinant protein or isoform.

Fig. 3 Immunodetection of *Sus scrofa* phosphorylated OBP isoforms. **a** anti-phosphoserine antibodies (1:500 dilution). **b** anti-phosphotyrosine antibodies (1:2,000 dilution). **c** anti-phosphothreonine antibodies (1:500 dilution). Treatments in wells are as described in Fig. 2. Secondary antibodies at 1:40,000 dilution (rabbit IgG, HRP linked whole antibodies, GE Healthcare). ECL Plus detection, 1 min exposure. Molecular weight markers are not labeled with specific antibodies (wells 1 and 7)

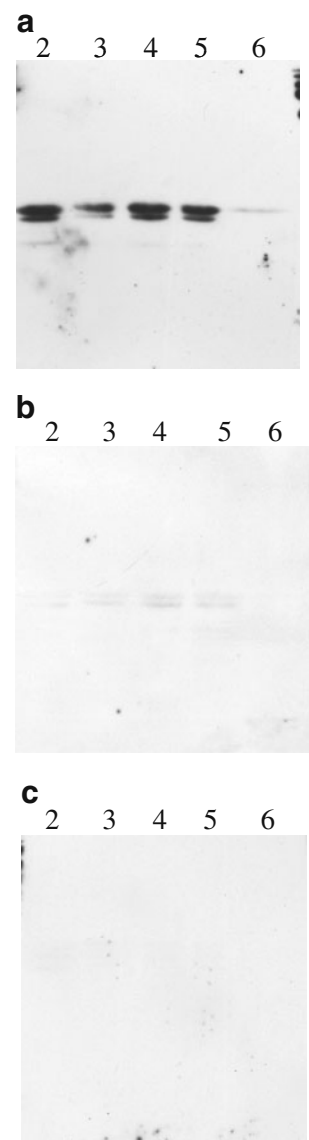


Table 1 Beta-Elimination followed by Michael Addition of Dithiothreitol (BEMAD, DTT) performed on SDS-PAGE band containing *Sus scrofa* total OBP-Pichia to identify phosphorylation sites

Calculated mass (Da)				Measured mass ^a (M+H) ⁺	Peptide	Peptide sequence
No DTT	1 DTT	2 DTT	3DTT			
719.3722	855.5722			855.2951 (T+CT; 50%)	11–16	ELS ^(b) GKW
1950.9807		2223.3807		2223.2814 (CT; 50%)	21–38	IGS ^(b) S ^(b) DLEKIGENAPFQVF
2259.0750	2395.2750			2395.0388 (T; 50%)	29–47	IGENAPFQVFMRS ^(b) IEFDDK
721.3362	857.5362			857.9682 (T+CT; 25%)	45–50	DDKES ^(b) K
1096.5520		1368.9520		1368.8852 (CT; 50%)	45–53	DDKES ^(b) KVY ^(b) L
1017.5404		1289.9404		1289.7211 (T; 25%)	51–58	VY ^(b) LNFFS ^(b) K
755.4086	891.6086			891.3784 (T+CT; 25%)	53–58	LNFFS ^(b) K
1825.9000				1826.2253 (T+CT; 25%)	57–72	<i>SKENGICEEFSLIGTK</i>
1539.7359		1812.1359		1811.7640 (T+CT; 50%)	59–72	ENGICEEFS ^(b) LIGT ^(b) K
2232.0125				2231.9151 (T+CT; 25%)	59–78	<i>ENGICEEFSLIGTKQEGNTY</i>
618.3821		890.7821		890.6533 (T+CT; 50%)	67–72	S ^(b) LIGT ^(b) K
1310.6586			1719.2586	1719.1245 (T+CT; 50%)	67–78	S ^(c) LIGT ^(c) KQEGNT ^(c) Y ^(c)
711.2944		983.6944		983.5456 (T+CT; 25%)	73–78	QEGNT ^(b) Y ^(b)
994.4588	1130.6588			1130.5890 (T+CT; 50%)	79–87	DVNY ^(b) AGNNK
1098.5578				1098.6254 (CT; 25%)	83–92	<i>AGNNKFVVS</i>
1039.5306			1448.1306	1448.2532 (CT; 50%)	89–98	VVS ^(c) Y ^(c) AS ^(c) ET ^(c) AL
1806.8789	1943.0789			1943.2798 (CT; 25%)	99–114	IIS ^(c) NINVDEEGDKT ^(c) IM
933.5437	1069.7437			1069.8632 (T; 50%)	112–120	T ^(c) IMT ^(c) GLLGK
949.5386		1221.9386		1221.7853 (T+CT; 50%)	112–120	T ^(b) IMT ^(b) GLLGK
2352.2517				2351.8611 (CT; 25%)	133–152	<i>KEVTRENGIPEENIVNIER</i>
2853.4046	2989.6046			2989.6503 (T; 25%)	134–158	EVT ^(b) RENGIPEENIVNIERDDCPAK

^a Peptides derived from analysis after enrichment by thiol chromatography (Trypsin T, Chymotrypsin CT, T+CT) and elution at different percentages of acetonitrile

^b Denotes mass addition at a Ser, Tyr, or Thr residue, indicating modification by dithiothreitol (DTT)

^c Denotes potential phosphorylation at a Ser, Tyr, or Thr residue. Peptides unmodified by DTT addition are italicized

Table 2 Beta-Elimination followed by Michael Addition of Dithiothreitol (BEMAD, DTT) performed on SDS-PAGE band containing *Sus scrofa* OBP-CHO isoform to identify phosphorylation sites

Calculated mass (Da)		Measured mass ^a (M+H) ⁺	Peptide	Peptide sequence
No DTT	1 DTT			
1711.7809	1847.9809	1847.9952 (T; 25%)	1–15	QEPQPEQDPFELS ^(b) GK
1197.5633	1333.7633	1333.9876 (T; 50%)	41–50	S ^(c) IEFDDKES ^(c) K
1226.5358	1362.7358	1362.8638 (T+CT; 50%)	57–66	S ^(b) KENGICEEF
2827.3917	2963.5917	2963.9894 (CT; 50%)	89–114	VVS ^(c) Y ^(c) AS ^(c) ET ^(c) ALIIS ^(c) NINVDEEGDKT ^(c) IM
1262.5746	1398.7746	1398.7400 (T; 25%)	121–131	GT ^(b) DIEDQDLEK
1537.7380		1538.0132 (T+CT; 25%)	121–133	<i>GTDIEDQDLEKFK</i>
2352.2517		2352.7411 (CT; 25%)	133–152	<i>KEVTRENGIPEENIVNIER</i>
2224.1567		2224.2769 (T; 50%)	134–152	<i>EVTRENGIPEENIVNIER</i>

^a Peptides derived from analysis after enrichment by thiol chromatography (Trypsin T, Chymotrypsin CT, T+CT) and elution at different percentages of acetonitrile

^b Denotes mass addition at a Ser, Tyr, or Thr residue, indicating modification by dithiothreitol (DTT)

^c Denotes potential phosphorylation at a Ser, Tyr, or Thr residue. Peptides unmodified by DTT addition are italicized. Ser 13, Ser57, and Thr122 are phosphorylated, whereas Ser41, Ser49, Ser91, Tyr 92, Ser94, Thr96, Ser101, and Thr112 are potentially phosphorylated

Table 3 Beta-Elimination followed by Michael Addition of Dithiothreitol (BEMAD, DTT) performed on SDS-PAGE band containing *Sus scrofa* OBP-Pichia-iso2 to identify phosphorylation sites

Calculated mass			Measured mass ^a (M+H) ⁺	Peptide	Peptide sequence
No DTT	1 DTT	2 DTT			
1711.7809			1711.0458 (T; 50%)	1–15	<i>QEPQPEQDPFELSGK</i>
719.3722	855.5722		855.4926 (T+CT; 25%)	11–16	ELS ^(b) GKW
1950.9807		2223.3807	2223.2927 (CT; 50%)	21–38	IGS ^(b) S ^(b) DLEKIGENAPFQVF
1172.5768	1308.7768		1308.6959 (T+CT; 50%)	36–44	QVFMRS ^(b) IEF
1096.5520		1368.9520	1368.7275 (CT; 50%)	45–53	DDKES ^(b) KVY ^(b) L
1017.5404	1153.7404		1153.6753 (T; 50%)	51–58	VY ^(c) LNFFS ^(c) K
1017.5404		1289.9404	1289.6857 (T; 25%)	51–58	VY ^(b) LNFFS ^(b) K
1355.6147	1491.8147		1491.8855 (CT; 50%)	57–68	S ^(c) KENGICEEFS ^(c) L
2518.1766			2518.3683 (CT; 50%)	57–78	<i>SKENGICEEFLIGTKQEGNTY</i>
618.3821		890.7821	890.4685 (T+CT; 50%)	67–72	S ^(b) LIGT ^(b) K
2233.0520	2369.2520		2369.3125 (CT; 50%)	69–88	IGT ^(c) KQEGNT ^(c) Y ^(c) DVNY ^(c) AGNNKF
994.4588			994.7456 (T+CT; 50%)	79–87	<i>DVNYAGNNK</i>
949.5386	1085.7386		1085.4845 (T; 25%)	112–120	T ^(c) IMT ^(c) GLLGK
632.3726	768.5726		768.0517 (CT; 25%)	133–137	KEVT ^(b) R
2352.2517			2352.2819 (CT; 25%)	133–152	<i>KEVTRENGIPEENIVNIIER</i>
2981.4996			2981.6791 (CT; 50%)	133–158	<i>KEVTRENGIPEENIVNIIERDDCPAK</i>

^a Peptides derived from analysis after enrichment by thiol chromatography (Trypsin T, Chymotrypsin CT, T+CT) and elution at different percentages of acetonitrile. The corresponding spectra are shown in Supplementary Figs. 1, 2, and 3

^b Denotes mass addition at a Ser, Tyr, or Thr residue, indicating modification by dithiothreitol (DTT)

^c Denotes potential phosphorylation at a Ser, Tyr, or Thr residue. Peptides unmodified by DTT addition are italicized

The results obtained for the total recombinant OBPs were compared to those obtained for the native protein in the same experimental conditions (Nagnan-Le Meillour et al. 2009b; Table 5). Ser13, Ser41, Ser49, and Ser57 are phosphorylated in the three proteins (OBP-native, OBP-Pichia and OBP-CHO). The phosphorylation of Ser23, Ser24, Tyr52, Ser67, Thr71, Tyr82 is common to the OBP-native and OBP-Pichia, while Ser91, Tyr92, Ser94, Thr96, Ser101, Thr112, and Thr115 are possibly phosphorylated in the recombinant OBP-Pichia and OBP-CHO, but never in the native OBP. These special features shared by recombinant proteins could indicate differences between the phosphorylation processes in the three eukaryotic cells.

The OBP-CHO isoform is less affected globally by phosphorylation (Tables 2 and 5). This could mean that the protein is indeed less phosphorylated in CHO cells, or that the quantity of recombinant OBP-CHO is too small to provide a representative phosphorylation pattern of the protein through the single isoform that could be obtained by purification, even after a ten-fold concentration of the culture supernatant. Other isoforms could exist but in too small quantity to be detected and analyzed. Whatever the case, it was not possible to perform binding assays with such small quantities, and we did not consider further the recombinant OBP from CHO in this work.

Despite the combined use of T and CT to obtain the best assignment of phosphorylation sites, some ambiguous positions remained, in particular in peptides 89–98 and 99–114 from OBP-Pichia (Table 1), and in peptide 89–114 from OBP-CHO (Table 2). For example, three DTT are linked to the peptide 89–98 bearing 4 potential phosphorylation sites (Ser91, Tyr92, Ser94, Thr96), and peptide 99–114 bears only one DTT, but 2 sites could be phosphorylated, Ser 101 and Thr112. Besides these ambiguities in the sites location, several masses observed for one given peptide suggest the presence of more heterogeneity: peptide 112–120 of total OBP-Pichia (Table 1) could be phosphorylated on either Thr112 or Thr115 (mass 1069.7437 Da for one DTT), or on both amino acids (mass 1221.9386 Da for 2 DTT). In OBP-Pichia-iso2, this peptide is modified by only one DTT (mass of 1085.4845 Da, Table 3), so that either Thr112 or Thr115 is phosphorylated. In OBP-Pichia-iso3, the same peptide bears 2 DTT, indicating that both residues are phosphorylated. The presence of several forms of different peptides increases the number of possible combinations that could be estimated as 114 for total OBP-Pichia, 15 for OBP-Pichia-iso2, and 44 for OBP-Pichia-iso3 (data not shown). Obviously, all these isoforms do not exist, but the presence of the same peptides with different phosphorylation status suggests a much higher

Table 4 Beta-Elimination followed by Michael Addition of Dithiothreitol (BEMAD, DTT) performed on SDS-PAGE band containing *Sus scrofa* OBP-Pichia-iso3 to identify phosphorylation sites

Calculated mass (Da)				Measured mass ^a (M+H) ⁺	Peptide	Peptide sequence
No DTT	1 DTT	2 DTT	3DTT			
533.2929	669.4929			669.2454 (T+CT; 25%)	11–15	ELS ^(b) GK
2259.0750	2395.2750			2395.2038 (T; 50%)	29–47	IGENAPFQVFMRS ^(b) IEFDDK
2243.0801				2243.4810 (T; 50%)	29–47	<i>IGENAPFQVFMRSIEFDDK</i>
655.3450	791.5450			791.0705 (T+CT; 50%)	51–55	VY ^(b) LNF
1155.4986	1291.6986			1291.1699 (T+CT; 25%)	57–66	S ^(b) KENGICEEF
2518.1766				2518.1952 (CT; 25%)	57–78	<i>SKENGICEEFLIGTKQEGNTY</i>
1539.7359		1812.1359		1811.7640 (T+CT; 50%)	59–72	ENGICEEFS ^(b) LIGT ^(b) K
1310.6586			1719.2586	1719.2498 (T+CT; 50%)	67–78	S ^(c) LIGT ^(c) KQEGNT ^(c) Y ^(c)
711.2944		983.6944		983.0770 (T+CT; 25%)	73–78	QEGNT ^(b) Y ^(b)
994.4588	1130.6588			1130.3285 (T+CT; 50%)	79–87	DVNY ^(b) AGNNK
1098.5578				1098.6248 (T+CT; 25%)	83–92	<i>AGNNKFVVS</i>
1039.5306			1448.1306	1448.5877 (CT; 25%)	89–98	VVS ^(c) Y ^(c) AS ^(c) ET ^(c) AL
2078.0321		2350.4321		2350.5974 (CT; 50%)	99–117	IIS ^(c) NINVDEEGDKT ^(c) IMT ^(c) GL
949.5386		1221.9386		1221.6399 (T+CT; 50%)	112–120	T ^(b) IMT ^(b) GLLGK
2352.2517				2352.6148 (CT; 50%)	133–152	<i>KEVTRENGIPEENIVNIER</i>
2981.4996				2981.8129 (CT; 50%)	133–158	<i>KEVTRENGIPEENIVNIERDDCPAK</i>
2224.1567				2224.4837 (T; 50%)	134–152	<i>EVTRENGIPEENIVNIER</i>

^a Peptides derived from analysis after enrichment by thiol chromatography (Trypsin T, Chymotrypsin CT, T+CT) and elution at different percentages of ACN. The corresponding spectra are shown in Supplementary Figs. 4, 5, and 6

^b Denotes mass addition at a Ser, Tyr, or Thr residue, indicating modification by dithiothreitol (DTT)

^c Denotes potential phosphorylation at a Ser, Tyr, or Thr residue. Peptides unmodified by DTT addition are italicized

Table 5 Phosphorylation patterns of recombinant *Sus scrofa* OBPs

	OBP-native ^a	OBP-Pichia	OBP-Pichia-iso2	OBP-Pichia-iso3	OBP-CHO
	Ser13	Ser13	Ser13	Ser13	Ser13
	Ser23	Ser23	Ser23		
	Ser24	Ser24	Ser24		
	Ser41	Ser41	Ser41	Ser41	<i>Ser41</i>
	Ser49	Ser49	Ser49		<i>Ser49</i>
	Tyr52	Tyr52	Tyr52	Tyr52	
	Ser57	Ser57	Ser57	Ser57	Ser57
	<i>Ser67^b</i>	Ser67	Ser67	Ser67	
	<i>Thr71</i>	Thr71	Thr71	Thr71	
		Thr77	<i>Thr77</i>	Thr77	
		Tyr78	<i>Tyr78</i>	Tyr78	
	Tyr82	Tyr82	<i>Tyr82</i>	Tyr82	
		<i>Ser91</i>		<i>Ser91</i>	<i>Ser91</i>
		<i>Tyr92</i>		<i>Tyr92</i>	<i>Tyr92</i>
		<i>Ser94</i>		<i>Ser94</i>	<i>Ser94</i>
		<i>Thr96</i>		<i>Thr96</i>	<i>Thr96</i>
		<i>Ser101</i>		<i>Ser101</i>	<i>Ser101</i>
		Thr112	<i>Thr112</i>	Thr112	<i>Thr112</i>
		Thr115	<i>Thr115</i>	Thr115	
	Thr122				Thr122
		Thr136	Thr136		

^a Phosphorylation sites of native OBP were determined in Nagnan-Le Meillour et al. (2009b)

^b Potentially phosphorylated amino acids are italicized

number of isoforms than the two obtained by HPLC purification. Indeed, it is visible in SDS-PAGE (Fig. 2a) that each protein is composed of two bands, even after strong anion exchange purification. This means that each OBP-Pichia isoform should be purified further by a second different HPLC system.

Ligand Binding Monitored by Fluorescence Spectroscopy
 Recombinant proteins obtained by expression in CHO cells were in too small quantities to perform ligand binding studies, despite adaptation of the method of fluorescence spectroscopy to the use of purified isoforms. We, thus, measured the affinity of the two isoforms expressed in the yeast (OBP-Pichia-iso2 and OBP-Pichia-iso3) for five selected ligands, all of biological relevance in the porcine species (androstenol, androstenone, testosterone, palmitic acid, and myristic acid). The two isoforms were first titrated

with the fluorescent probe, AMA, and displayed comparable affinity to total OBP-Pichia. However, OBP-Pichia-iso3 presents a slightly better affinity for AMA than OBP-Pichia-iso2. The K_{d-AMA} were estimated to $0.56 \pm 0.04 \mu\text{M}$, $0.46 \pm 0.03 \mu\text{M}$ and $0.55 \pm 0.04 \mu\text{M}$, for OBP-Pichia-iso2, OBP-Pichia-iso3 and total OBP-Pichia (Nagnan-Le Meillour et al. 2009a), respectively. Competitive binding experiments then were carried out with proteins saturated with $3.75 \mu\text{M}$ AMA. The displacement curves are reported in Fig. 4 and the calculated binding constants are listed in Table 6. Recombinant OBPs from *P. pastoris*, isoforms or total protein, did not bind testosterone. This result was expected from the in-gel binding assay with native OBP that did not bind testosterone (Le Danvic et al. 2009), which is the natural ligand of VEG (Von Ebner's Gland protein), another protein of the nasal mucus. Whatever the ligand, OBP-Pichia-iso2 displayed

Fig. 4 Competitive binding assays of five selected ligands of biological relevance to recombinant *Sus scrofa* OBPs expressed by the yeast. Proteins were assayed at $2.5 \mu\text{M}$ and saturated with $3.75 \mu\text{M}$ of the fluorescent probe 1-AMA. Competitors were added at increasing concentration from 0 to $15 \mu\text{M}$. **a** Total OBP-Pichia; **b** OBP-Pichia-iso2; and **c** OBP-Pichia-iso3

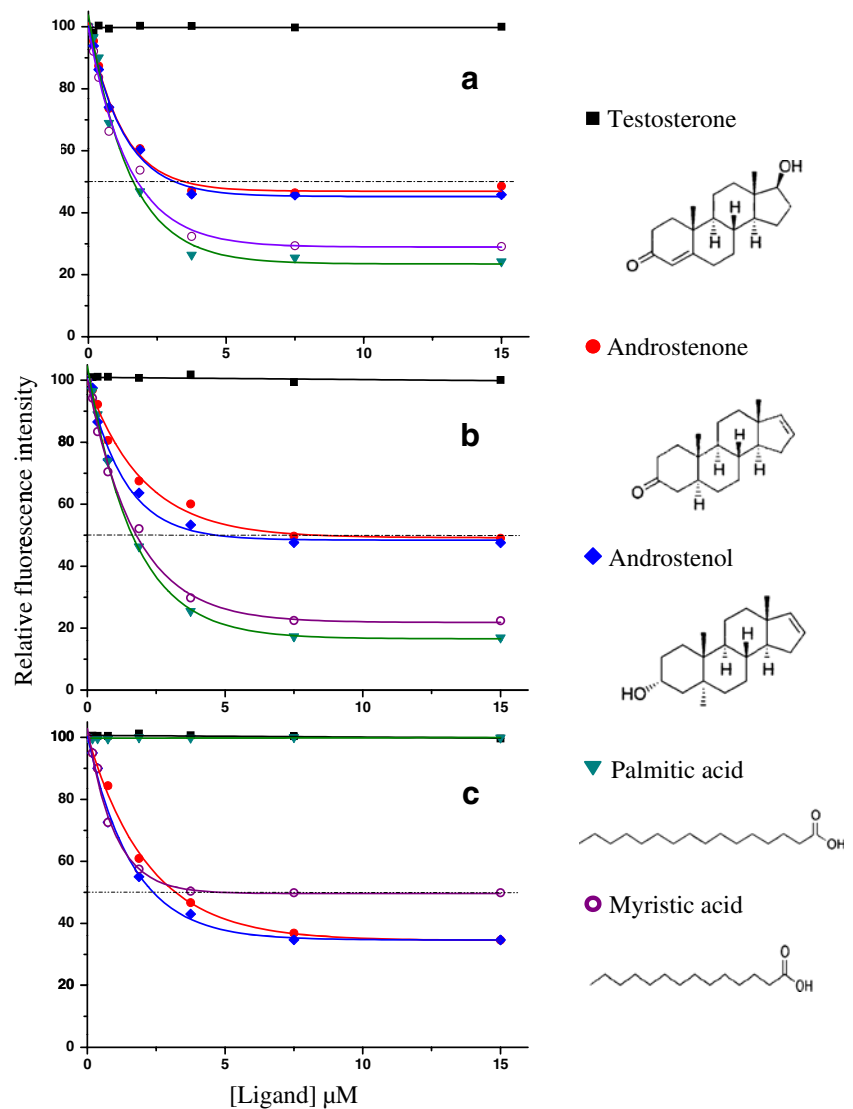


Table 6 Values of $[IC_{50}]$ and calculated dissociation constants relative to the binding of ligands (testosterone, androstenone, androstenol, palmitic acid and myristic acid) to total *Sus scrofa* OBP-Pichia, OBP-Pichia-iso2 and OBP-Pichia-iso3

Ligand	Total OBP-Pichia		OBP-Pichia-iso2		OBP-Pichia-iso3	
	IC_{50} (μ M)	K_d (μ M)	IC_{50} (μ M)	K_d (μ M)	IC_{50} (μ M)	K_d (μ M)
Testosterone	–	–	–	–	–	–
Androstenone	3.5	0.5	7.7	1.0	3.2	0.3
Androstenol	3.2	0.4	4.5	0.6	2.4	0.2
Palmitic acid	2.1	0.3	1.6	0.2	–	–
Myristic acid	2.2	0.3	1.8	0.2	4.3	0.5

the same behavior as total OBP-Pichia; that could be explained by the fact that it is the closest to total OBP-Pichia, in terms of phosphorylation. However, when compared to total OBP-Pichia, OBP-Pichia-iso2 presents a lesser affinity for androstenone and androstenol and a higher affinity towards the two fatty acids studied.

OBP-Pichia-iso3 presents very different behaviors according to the ligand. It has a high affinity for the pig sex steroids (androstenone: $K_d = 0.3$ and androstenol $K_d = 0.2$) but less affinity for myristic acid ($K_d = 0.5$), and it

displays no binding to palmitic acid, these two fatty acids differing only in the chain length, C_{14} and C_{16} , respectively. This isoform seems to be more likely tuned to steroids. This binding specificity could be relied on the absence of Thr136, Ser23, Ser24, Ser49, and Ser91 to Ser101, and the phosphorylation of the three residues Thr77, Tyr78, and Tyr82 (Table 5). It is surprising to note the important difference of affinity between the two OBP isoforms for palmitic acid, which is illustrated by the spectral data (Fig. 5). A marked decrease in the fluorescence intensity of

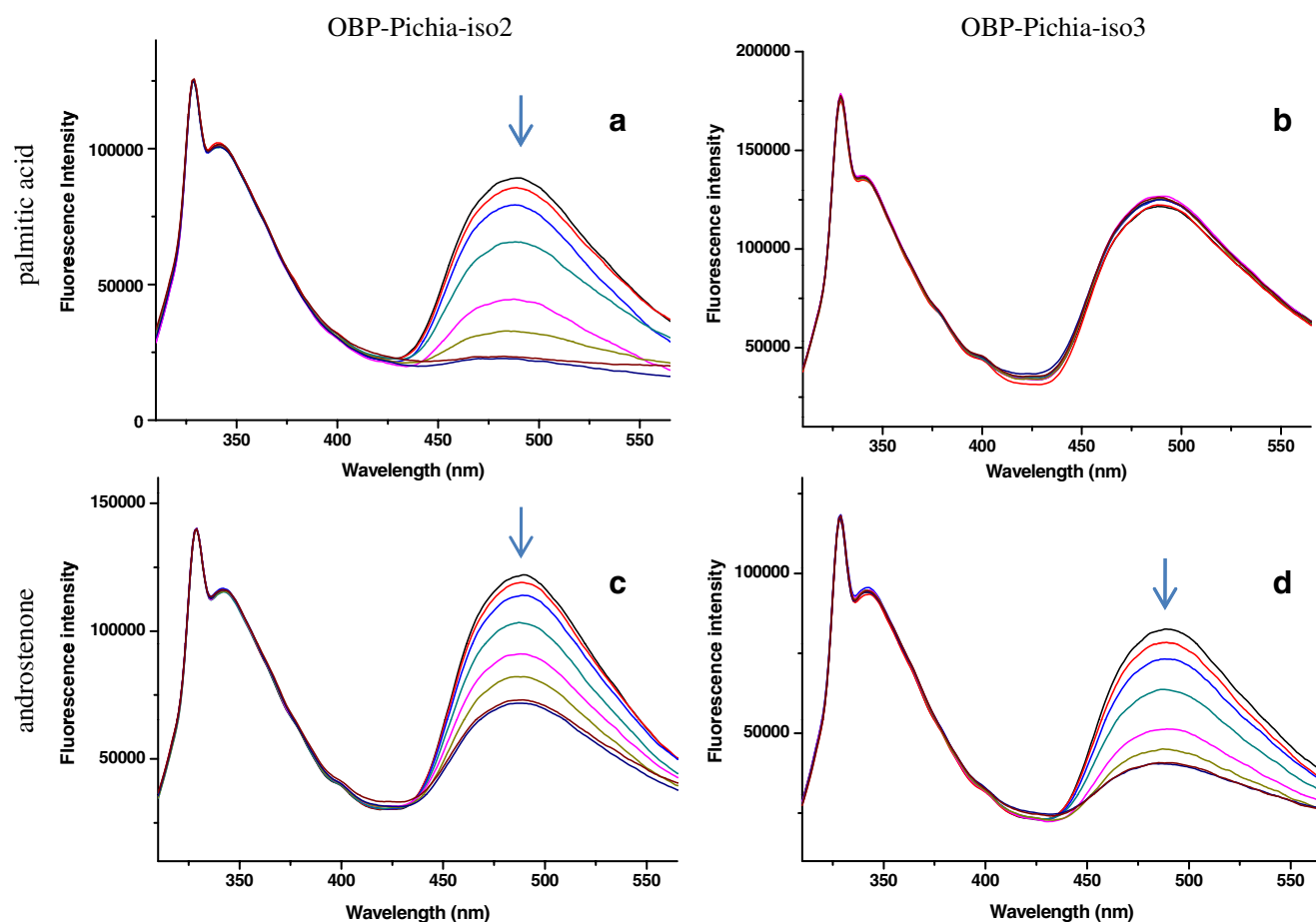


Fig. 5 Fluorescence spectra set for the competitive binding assay. **a** OBP-pichia-iso2-AMA/palmitic acid; **b** OBP-pichia-iso3-AMA/palmitic acid; **c** OBP-pichia-iso2-AMA/ androstenone; and **d** OBP-pichia-iso3-AMA/androstenone. [protein] = 2.5 μ M, [AMA] =

3.75 μ M, and [ligand] from 0 to 15 μ M (excitation wavelength: 295 nm). Arrows indicate the fluorescence decrease according to increasing ligand concentration

the AMA band (484 nm) is observed with successive additions of palmitic acid for OBP-Pichia-iso2 (Fig. 5a) while this ligand does not compete with AMA bound to OBP-Pichia-iso3 (Fig. 5b). This behavior is reversed to a lesser extent for androstenone where the fluorescence decrease of the probe is more pronounced for OBP-Pichia-iso3 (Fig. 5c) than for OBP-Pichia-iso2 (Fig. 5d). It also may be observed on spectra set of Fig. 5, normalized with the water Raman line (328 nm), that the protein fluorescence band (342 nm) is not affected by the substitution of AMA by ligands. Thus, the two isoforms selectivity are quite complementary, OBP-Pichia-iso2 presents a good affinity for fatty acids (components of the female appeasing pheromone, Guiraudie et al. 2003), while OBP-Pichia-iso3 has marked affinity for the male sex steroids (Katkov et al. 1972).

Location of Phosphate Groups on the 3-D Structure of Porcine OBP The phosphate groups were added to the OBP three-dimensional structure to visualize their position and predict their possible involvement into OBP-ligand interactions. As a starting point, the phosphorylated native OBP was constructed (Fig. 6a), as it bears residues that are always phosphorylated in the recombinant proteins (Table 5), except Thr122, non-phosphorylated in *Pichia* proteins. Phe35 was added, as we have shown that this residue participates in the reorientation of the ligand towards the exit of the protein (Nagnan-Le Meillour et al. 2009a), together with Tyr 82 that has a key-role in the binding and release processes (Golebiowski et al. 2006, 2007; Nagnan-Le Meillour et al. 2009a). In Fig. 6, these two residues are in the open position, for a better view of the binding pocket. In the closed position, they display

hydrophobic interactions, certainly reinforced by negative charges of the phosphate group born by Tyr82. Ser 23 could have interactions with ligands, as its side chain and phosphate group point to the internal cavity. Side chains and phosphates of the other phosphorylated residues clearly are positioned outside the binding pocket, pointing out to the surface of the protein. Interestingly, most of these residues are located on β -strands determined by X-ray crystallography (Spinelli et al. 1998): Ser23, Ser24 on β 1, Ser41 in β 2, Tyr52 and Ser57 in β 3, and Ser67 in β 4. Ser13 is located on the N-terminal flexible part, Ser49 on the loop between β 2 and β 3, and Thr122 on the loop near the α -helix.

In a second step, we highlighted on the 3-D structure the differences in phosphorylation patterns of the two *Pichia* isoforms studied for their binding properties (Fig. 6b, c). Contrary to the mapping of phosphorylation sites of native OBP, several ambiguities remained in the location of these sites in the two *Pichia* isoforms. We made the choice to represent all the possibly phosphorylated residues for each isoform. For OBP-Pichia-iso2 (Fig. 6b), either Thr77, or Tyr78, or Tyr82 is phosphorylated, but phosphate groups were added on the three because they have different positions in the structure: Thr77 is out of the binding pocket, Tyr78 is in the bottom of the binding pocket, and Tyr82 lines the gate. The alternative phosphorylation of these residues could influence strongly the binding, in particular if Tyr82 is not phosphorylated. These residues are phosphorylated in OBP-Pichia-iso3 (Fig. 6c), while Ser23, Ser24, and Ser49 are not. In addition, among Ser91, Tyr92, Ser94, Thr96, and Ser101, only one is phosphorylated in OBP-Pichia-iso3, but they are all represented with a phosphate group on the structure (Fig. 6c). They are located

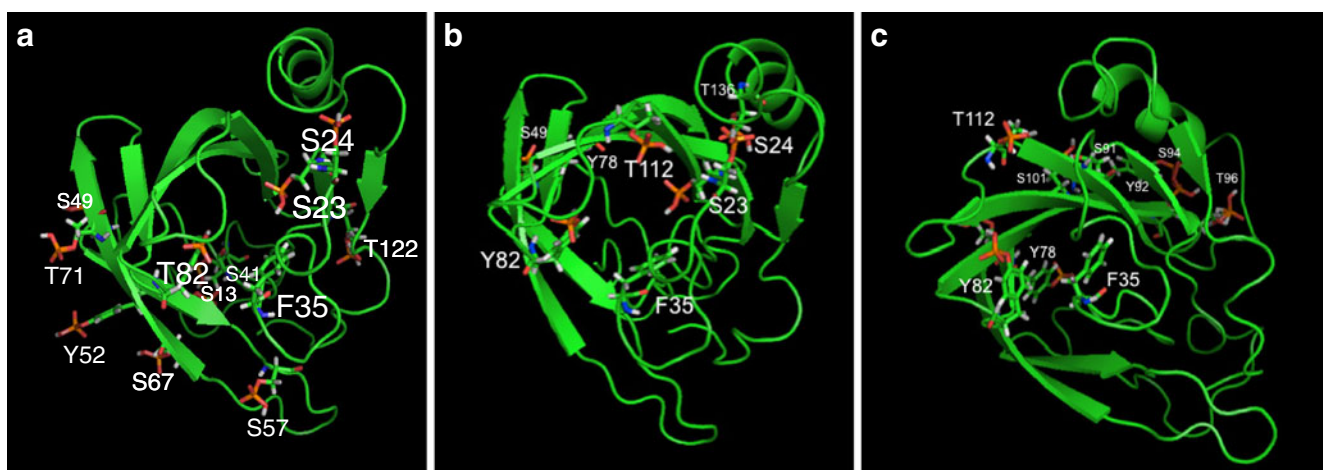


Fig. 6 Three-dimensional representation of phosphorylated porcine OBP. Images were generated from the modified PDB file (1E02) with MacPyMOL. The OBP backbone is represented as a ribbon (green). The side chains of the selected residues and their phosphates (orange)

are in stick representation. The identities of the residues are indicated (white). The protein is oriented with the face displaying the binding pocket. **a** Native OBP; **b** OBP-Pichia-iso2; and **c** OBP-Pichia-iso3

at the protein surface, so their involvement in the binding with ligand is less probable. Phosphate groups located at the protein surface could more likely be involved in OBP-OBP and/or OBP-receptor interactions. Moreover, the binding selectivity could result from different positions of the ligand in the binding cavity, constrained by changes in the structure upon phosphorylation/dephosphorylation of both internal and external residues. The location of phosphates in the structure helps to visualize the results, but docking experiments and molecular dynamics studies will be required to understand the electrostatic interactions that they could establish with the ligands.

In summary, OBP is secreted by Bowman's gland into the extracellular mucus lining the nasal cavity of *S. scrofa*. This secreted protein is not supposed to undergo phosphorylation in the rough endoplasmic reticulum compartment, as kinases and phosphatases are localized in the cytoplasm of the cell. However, there is evidence for the presence of ecto-enzymes at the cell surface in a variety of cell types, in particular ecto-kinases and ecto-phosphatases that have a potential role in intercellular regulation and reception and transduction of external stimuli (Nath et al. 2008). Our study indicates that the phosphorylation of secreted proteins is a mechanism that is common to yeast and mammalian cells. As phosphorylation is a dynamic mechanism, the results observed reflect the phosphorylation pattern of OBP at a given time, corresponding to a given physiological status of the cell (Mann et al. 2002). Differences in phosphorylation patterns of OBP produced by the three types of cells could arise from different ratio in the kinases (e.g., more Ser/Thr kinase in *Pichia* than in other cells), or from different responses to culture conditions (or the physiological state for the secreting cells). Taking into account the heterogeneity of recombinant proteins from different cells, an exhaustive study of ligand binding capacities now will be conducted with isoforms purified from pig nasal tissue. Fortunately, the large amount of OBP produced by an animal (5–15 mg) will allow structure function-relationship studies on native proteins.

In this perspective, the present ligand binding studies already have a biological meaning. Even though the two *Pichia* isoforms differ slightly from native isoforms, they display properties of binding to pheromonal ligands that are physiologically relevant. The ligands used in this study are pheromone components in the pig species. The two fatty acids are part of a maternal pheromone that has an appeasing effect on piglets (McGlone and Anderson 2002). Androstenol and androstenone are secreted by the sub maxillary glands into male saliva (Katkov et al. 1972), but only androstenone has been identified as a pheromone component that facilitates expression of both attraction to the male and a receptive mating stance in estrous females (Dorries et al. 1995). For adult females, androstenone is a sex pheromone, but for piglets, the perception of androstenone reduces

agonistic behaviors and is considered as a submissive pheromone (McGlone 1985; McGlone and Morrow 1988). Testosterone, the natural ligand of VEG (a pheromone binding protein) (Le Danvic et al. 2009), is never bound by any of the OBP isoforms. Conversely, both OBP isoforms bind a closely related steroid, androstenone, differing from testosterone by a single alcohol. Our results lead us to conclude that OBP is not a passive carrier of odorant or pheromonal molecules. Rather, OBP is a pool of isoforms with different binding properties, capable of distinguishing between two fatty acids differing by 2 CH₂ or between two steroids differing by an alcohol, ensuring a fine coding of molecules with a high significance in the mating or the maintaining of hierarchy inside the porcine species.

Acknowledgments The authors thank the University of Lille1 (USTL), the French INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), and CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) for funding.

References

- BRENNAN, P. A., and KENDRICK, K. M. 2006. Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 361:2061–2078.
- BRIAND, L., NESPOULOUS, C., PEREZ, V., RÉMY, J.-J., HUET, J.-C., and PERNOLLET, J.-C. 2000. Ligand-binding properties and structural characterization of a novel rat odorant-binding protein variant. *Eur. J. Biochem.* 267: 3079–3089.
- BUCK, L. 2004. Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutr. Rev.* 62:S184–188 & S224–241.
- BUROVA, T. V., CHOISET, C. K., JANKOWSKI, T., and HAERTLE, T. 1999. Conformational stability and binding properties of porcine odorant binding protein. *Biochemistry* 38:15043–15051.
- DALY, R. and HEARN, M. T. W. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18:119–138.
- DORRIES, K. M., ADKINS-REAGAN, E., and HALPERN, B. P. 1995. Olfactory sensitivity to the pheromone, androstenone, is sexually dimorphic in the pig. *Physiol. Behav.* 57:255–259.
- GOLEBIOWSKI, J., ANTONCZAK, S., and CABROL-BASS, D. 2006. Molecular dynamics studies of odorant binding protein free of ligand and complexed to pyrazine and octenol. *J. Mol. Struct. (Theochem)* 763:165–174.
- GOLEBIOWSKI, J., ANTONCZAK, S., FIORUCCI, S., and CABROL-BASS, D. 2007. Mechanistic events underlying odorant binding protein chemoreception. *Proteins* 67:448–458.
- 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.
- KATKOV, T., BOOTH, W. D., and GOWER, D. B. 1972. The metabolism of 16-androstenes in boar salivary glands. *Biochim. Biophys. Acta* 270:546–556.
- KATO, A. and TOUHARA, K. 2009. Mammalian olfactory receptors: pharmacology, G protein coupling and desensitization. *Cell. Mol. Life Sci.* 66:3743–3753.

- KO, H. J. and PARK, T. H. 2008. Enhancement of odorant detection sensitivity by the expression of odorant-binding protein. *Biosens. Bioelectron.* 23:1017–1023.
- KO, H. J., LEE, S. H., OH, E. H., and PARK, T. H. 2010. Specificity of odorant-binding proteins: a factor influencing the sensitivity of olfactory receptor-based biosensors. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33:55–62.
- LAKOWITZ, J. R. 1999. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd edition. Kluwer Academic/Plenum, New York.
- 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.* 35:741–751.
- LOËBEL, D., MARCHESE, S., KRIEGER, J., PELOSI, P., and BREER, H. 1998. Sub-types of odorant-binding proteins-Heterologous expression and ligand binding. *Eur. J. Biochem.* 254:318–324.
- 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.
- MCGLONE, J. J. 1985. Olfactory cues and pig agonistic behavior: evidence for a submissive pheromone. *Physiol. Behav.* 34:195–198.
- MCGLONE, J. J. and MORROW, J. L. 1988. Reduction of pig agonistic behavior by androstenone. *J. Anim. Sci.* 66:880–884.
- MCGLONE, J. J., and ANDERSON, D. L. 2002. Synthetic maternal pheromone stimulates feeding behavior and weight gain in weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 80:3179–3183.
- MCKERELL, A. D. Jr., BASHFORD, D., BELLOTT, R. L., DUNBRACK, R. L. JR., EVANSECK, J. D., FIELD, M. J., FISCHER, S., GAO, J., GUO, H., HA, S., JOSEPH-MCCARTHY, D., KUCHNIR, L., KUCZERA, K., LAU, F. T. K., MATTOS, C., MICHNICK, S., NGO, T., NGUYEN, D. T., PRODHOM, B., REIHER, W. E. III, ROUX, B., SCHLENKRICH, M., SMITH, J.-C., STOTE, R., STRAUB, J., WATANABE, M., WIORKIEWICZ-KUCZERA, J., YIN, D., and KARPLUS, M. 1998. All-atom empirical potential for molecular modelling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B* 102:3586.
- NAGNAN-LE MEILLOUR, P., LAGANT, P., CORNARD, J.-P., BRIMAU, F., LE DANVIC, C., VERGOTEN, G., and MICHALSKI, J.-C. 2009a. 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.
- NAGNAN-LE MEILLOUR, P., LE DANVIC, C., BRIMAU, F., CHEMINEAU, P., and MICHALSKI, J.-C. 2009b. Phosphorylation of native porcine olfactory binding proteins. *J. Chem. Ecol.* 35:752–760.
- NARHI, L. O., ARAKAWA, T., AOKI, K. H., ELMORE, R., ROHDE, M. F., BOONE, T., and STRICKLAND, T. W. 1991. The effect of carbohydrate on the structure and stability of erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 266:23022–23026.
- 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., TANFANI, F., FINI, C., BERTOLI, E., and PELOSI, P. 1999. Porcine odorant-binding protein: structural stability and ligand affinities measured by Fourier-transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1431:179–188.
- PARISI, M., MAZZINI, A., TIBOR SORBI, R., RAMONI, R., GROLI, S., and FAVILLA, R. 2005. Role of the disulfide bridge in folding, stability and function of porcine odorant binding protein: Spectroscopic equilibrium studies on C63A/C155A double mutant. *Biochim. Biophys. Acta* 1750:30–39.
- PELOSI, P. 1996. Perireceptor events in olfaction. *J. Neurobiol.* 30:3–19.
- PELOSI, P. 2001. The role of perireceptor events in vertebrate olfaction. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:503–509.
- PELOSI, P., BALDACCINI, N. E., and PISANELLI, A. M. 1982. Identification of a specific olfactory receptor for 2-isobutyl-3-methoxypyrazine. *Biochem. J.* 201:245–248.
- SPINELLI, S., RAMONI, R., GROLI, S., BONICEL, J., CABBILLAU, C., and TEGONI, M. 1998. The structure of the monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism. *Biochemistry* 37:7913–7918.
- TCATCHOFF, L., NESPOULOUS, C., PERNOLLET, J.-C., and BRIAND, L. 2006. A single lysyl residue defines the binding specificity of human odorant-binding protein for aldehydes. *FEBS Lett.* 580:2102–2108.
- TIRINDELLI, R., DIBATTISTA, M., PIFFERI, S., and MENINI, A. 2009. From pheromones to behavior. *Physiol. Rev.* 89:921–956.
- VIDIC, J., GROSCLAUDE, J., MONNERIE, R., PERSUY, M. A., BADONNEL, K., BALLY, C., CAILLOL, M., BRIANT, L., SALESSE, R., and 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* 8:678–688.
- VINCENT, F., SPINELLI, S., RAMONI, R., GROLI, S., PELOSI, P., CABBILLAU, C., and TEGONI, M. 2000. Complexes of odorant binding protein with odorant molecules belonging to different chemical classes. *J. Mol. Biol.* 300:127–139.
- WEI, Y., BRANDAZZA, A., and PELOSI, P. 2008. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutants of odorant-binding protein: a first step towards biosensors for environmental monitoring. *Biochim. Biophys. Acta* 1784:666–671.

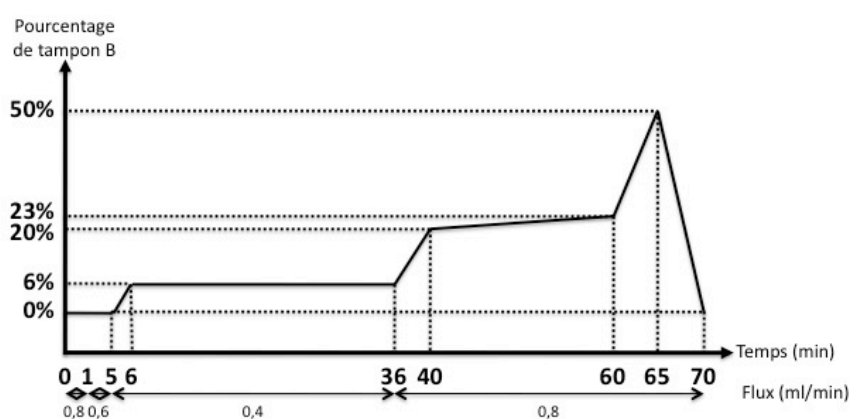
CHAPITRE 4 : Purification, identification et propriétés fonctionnelles des isoformes de VEG et d'OBP de la muqueuse respiratoire

I. Contexte et objectifs

Les résultats exposés dans le chapitre 3 ont montré que les sites de phosphorylation diffèrent entre les protéines synthétisées par les cellules de porc (mélange total d'isoformes, étudié dans le chapitre 2), les cellules de la lignée CHO (une isoforme) et les cellules de la levure *P. pastoris* (4 isoformes). La suite logique de ce travail a été de purifier et d'analyser les isoformes d'OBP et de VEG de la muqueuse respiratoire, sur des aliquots d'échantillons identiques à ceux utilisés dans le chapitre 2. La préparation des échantillons est donc décrite en détail dans la section "Methods and Materials" de l'article (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b). De même, il ne sera fait qu'un bref rappel des techniques utilisées pour la purification, l'immunodétection, la cartographie peptidique et le BEMAD, et le lecteur est invité à se reporter aux descriptions complètes dans les publications insérées dans ce mémoire.

II. Purification des protéines par HPLC en échange d'anions

Les protéines contenues dans les extraits de muqueuse respiratoire d'animal pré-pubère sont séparées par HPLC sur colonne échangeuse d'anions selon le protocole décrit dans l'article Brimau *et al.* (2010), avec les modifications suivantes du programme:



Un chromatogramme typique d'une injection est représenté Figure 24-A. Treize fractions principales (1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 5, 6, 7, 8, 8a, 9 et 10) ont été collectées manuellement au cours de chaque analyse et les aliquots de chaque fraction ont été rassemblés pour les analyses ultérieures. L'équivalent d'une injection a été utilisé pour réaliser un SDS-PAGE et

contrôler la teneur protéique de chaque fraction. Le gel représenté Figure 24-B montre l'absence (ou la présence indétectable) de protéine dans les fractions 2, 3, 6 et 7. La fraction 1 contient une protéine différente de la VEG et de l'OBP, qui n'a pu être caractérisée. Les études ultérieures se sont donc focalisées sur les fractions 4, 4a, 4b, 5, 8, 8a, 9 et 10. La quantité de protéine dans chaque fraction (Figure 24-B) est proportionnelle à l'aire du pic correspondant (Figure 24-A).

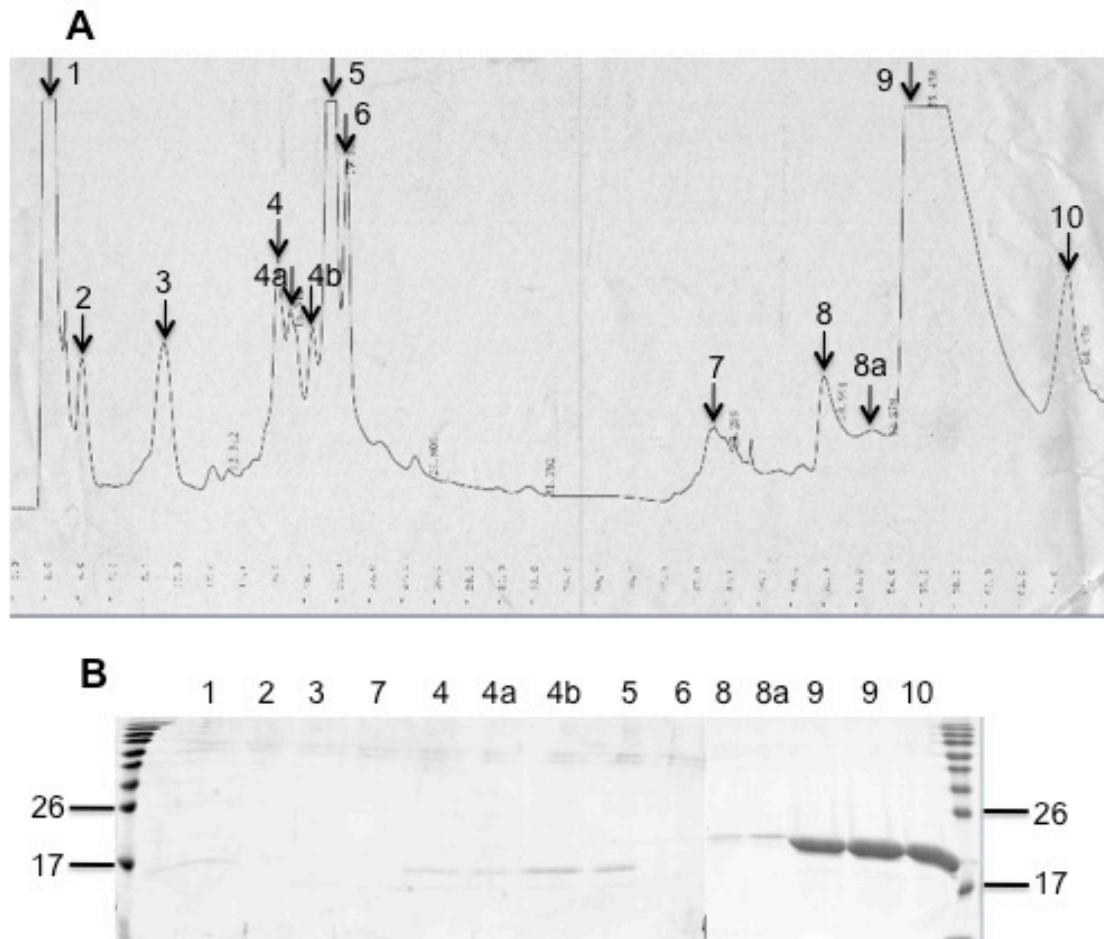


Figure 24 : Séparation des protéines de la muqueuse respiratoire par HPLC sur colonne échangeuse d'anions. 1-A: Chromatogramme typique d'une injection. Les fractions (numérotées 1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 5, 6, 7, 8, 8a, 9 et 10) sont collectées manuellement. 1-B: SDS-PAGE des fractions collectées lors d'une injection.

III. Immunodétection de l'OBP et de la VEG

Pour localiser la VEG et l'OBP, les fractions collectées après la séparation par HPLC sont soumises à des western-blot (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b) en utilisant les anticorps spécifiques anti-VEG (don du Professeur P. Pelosi) et anti-OBP (synthétisés au laboratoire, Decottignies et Nagnan-Le Meillour).

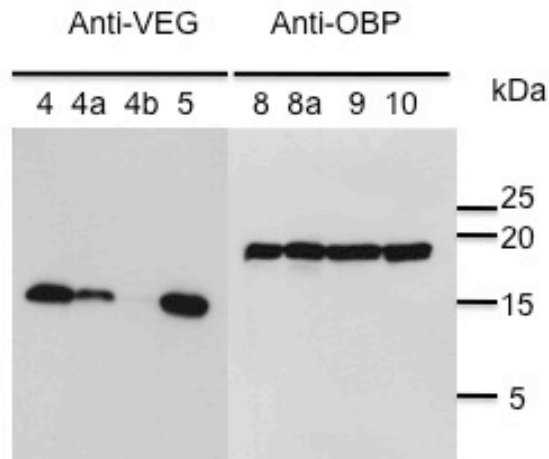


Figure 25 : Immunodétection de la VEG et de l'OBP dans les fractions issues de la séparation par HPLC. Les fractions 4, 4a, 4b et 5 ont été analysées avec l'anti-VEG (dilution de 1/5 000) et les fractions, 8, 8a, 9 et 10 avec l'anti-OBP (1/30 000). Les anticorps secondaires ont été utilisés à la dilution de 1/40 000. Détection ECL+ (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b).

Les fractions 4, 4a et 5 sont très immunoréactives à l'anticorps anti-VEG et la fraction 4b est légèrement immunoréactive (Figure 25). Compte tenu de leur temps de rétention (et donc de leur charge), nous n'avons pas pensé que les fractions 8 à 10 pouvaient contenir de la VEG, ces fractions n'ont donc pas été testées avec l'anti-VEG. Les fractions 8 à 10 sont très réactives à l'anti-OBP (Figure 25). Les quantités de protéines déposées dans les puits sont identiques (5 µg). On note que les protéines contenues dans les fractions 4 à 5 ont une masse moléculaire apparente inférieure à celle attendue pour la VEG (masse moléculaire théorique de 17 444 Da).

IV. Identification des isoformes purifiées par cartographie peptidique

Les Fractions sont déposées sur un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie colloïdal après migration (Figure 24-B). Les bandes sont découpées puis traitées selon le protocole décrit en détail dans Nagnan-Le Meillour *et al.* (2009b). Les peptides sont élués dans la matrice (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) avec différents pourcentages d'acétonitrile.

Les cartes peptidiques obtenues à partir des spectres de MALDI-TOF (présentés en Annexe 1) sont comparées aux cartes théoriques de l'OBP et de la VEG après traitement avec la trypsine (www.expasy.org). Les résultats (Tableau 1) montrent que les isoformes 4, 4a, 4b et 5 correspondent à de la VEG avec 75,8% de recouvrement pour les isoformes 4 et 4a, et 83,4% de recouvrement pour les isoformes 4b et 5. Le peptide manquant est le 32-70 soient

38 acides aminés pour une masse d'environ 3800 Da que l'on retranche à la masse de la VEG pour aboutir à une masse moléculaire apparente d'environ 15 kDa, correspondant à la masse apparente des isoformes 4 et 4a sur le gel de la Figure 24-B. Le même calcul effectué pour les fractions 4b et 5, pour lesquelles le peptide 43-70 est manquant, donne une masse apparente des protéines de 15,3 kDa, compatible avec leur position sur le gel Figure 24-B.

Modifications	Masse théorique	Peptide	Masse observée	
			isoforme 4	isoforme 4a
PYRR:1	1750.9122	1-16	1750.5445 (3)	1750.7064 (3)
	1767.9388	1-16	1767.4886 (2)	1767.7338 (1)
	1735.8723	17-31	1735.3264 (1)	1735.5773 (1)
	1145.5507	21-31	1145.2656 (1)	
	1489.6958	71-83		1489.9356 (1)
	1645.7969	71-84	1645.3997 (2)	
	1074.6670	84-92	1074.3747 (2)	1074.5231 (2)
Cys_CAM:101	2266.0808	93-111		2266.2540 (2)
	2323.1023	93-111	2323.5640 (2)	
MSO:112	2612.2483	93-114		2612.0829 (2)
	2303.1336	112-131	2303.2001 (3)	
Cys_CAM:152	2412.2153	115-135	2411.9589 (1)	2411.9427 (1)
	2341.1564	136-157	2340.9074 (2)	2354.8701 (1)

Modifications	Masse théorique	Peptide	Masse observée	
			isoforme 4b	isoforme 5
PYRR:1	1750.9122	1-16		1750.7002 (3)
	1767.9388	1-16	1767.7734 (1)	1767.7734 (1)
	1735.8723	17-31	1735.7566 (1)	1735.6450 (1)
	2351.2890	21-42		2351.3076 (2)
MSO:22	2367.2839	21-42	2367.4580 (2)	
	1645.7969	71-84	1645.9355 (2)	1645.8831 (2)
	1074.6670	84-92	1074.6075 (2)	1074.5389 (2)
	2266.0808	93-111	2266.3023 (1)	
Cys_CAM:101	2323.1023	93-111		2323.4168 (2)
MSO:112	2612.2483	93-114	2612.6516 (3)	2612.6516 (3)
	2038.9174	95-111		2038.9154 (1)
	2412.2153	115-135	2412.6984 (1)	2412.2829 (1)
	2186.0723	119-137	2186.2087 (3)	
	2284.1350	136-157	2284.2335 (3)	
Cys_PAM:152	2355.1721	136-157		2355.1397 (1)
Cys_CAM:152	2142.0244	138-157		2141.8742 (3)

Tableau 1: Cartographie peptidique des fractions 4, 4a, 4b et 5 correspondant à la VEG. Entre parenthèses est indiqué le pourcentage d'acétonitrile avec lequel le peptide a été élué: 12% (1), 25% (2), 50% (3). PYRR:1, pyrrolidone carboxylic acid; Cys_CAM, carbamidomethyl cysteine; Cys_PAM, propionamido cysteine; MSO, methionine sulfoxide.

La cartographie peptidique des fractions 8 et 8a (Tableau 2) montre qu'elles sont composées d'OBP seule, avec un recouvrement de 75,2% pour les protéines contenues dans les deux fractions. Dans les deux cas, le peptide 73-111 est manquant, il a une masse théorique de 4281.0105 Da, qui est en dehors de la limite de détection en spectrométrie de masse MALDI-TOF. Il n'est donc jamais retrouvé lors de ces analyses. La migration des fractions en SDS-PAGE (Figure 24-B) confirme que les deux formes d'OBP des fractions 8 et 8a correspondent à la protéine entière. Les échantillons étant issus de tissu d'animaux pré-pubères, on pouvait s'attendre à retrouver des peptides de l'extrémité C-terminale incluant la Lys 158. Or, pour les deux fractions, des pics bien nets (ne faisant pas partie du bruit de fond, voir les spectres en Annexe 1), correspondant à une extrémité C-terminale avec Ala sont observés. Ces résultats suggèrent que l'OBP + Lys 158, jusque là considérée comme un variant juvénile (Guiraudie *et al.*, 2003) pourrait bien en réalité être un variant allélique de l'OBP - Lys 158. Ainsi, l'un ou l'autre variant serait exprimé indifféremment chez les adultes ou chez les porcelets.

Modifications	Masse théorique	Peptide	Masse observée	
			Fraction 8	Fraction 8a
PYRR:1	1711.7809	1-15	1711.5368 (1)	1711.6014 (1)
	1498.7424	16-28		1498.5159 (2)
	2888.4287	16-40	2888.0618 (2)	
	1408.7041	29-40	1408.4805 (2)	1408.5297 (2)
MSO:39	1424.6991	29-40		1424.4935 (2)
	1197.5633	41-50	1197.3765 (1)	1197.4315 (1)
	2196.0859	41-58	2195.7835 (2)	
	1361.7099	48-58	1361.6070 (3)	1361.5514 (2)
	1539.7359	59-72	1539.7104 (3)	1539.7210 (3)
	933.5437	112-120	933.4108 (2)	933.3190 (2)
	2022.9978	121-137	2022.7186 (2)	2022.6439 (2)
	2224.1567	134-152	2223.9953 (3)	
Cys_CAM:155	2297.0714	138-157	2296.7610 (2)	

Tableau 2 : Cartographie peptidique des fractions 8 et 8a correspondant à l'OBP. Entre parenthèses est indiqué le pourcentage d'acétonitrile avec lequel le peptide a été élué: 12% (1), 25% (2), 50% (3). PYRR:1, pyrrolidone carboxylic acid; Cys_CAM, carbamidométhyl cysteine; MSO, methionine sulfoxide.

Les fractions 9 et 10 contiennent un mélange d'OBP et de VEG, comme le montrent les cartes peptidiques (Tableau 3). Les séquences des formes d'OBP sont identiques à 90,4% pour la protéine contenue dans la fraction 9 (73-87 manquant) et à 100% pour la protéine contenue dans la fraction 10. L'intégrité des deux formes est confirmée par leur migration à la taille attendue en SDS-PAGE (Figure 24-B). Les recouvrements de séquence de la VEG sont de 83% pour la fraction 9 et 79% pour la fraction 10. La partie de séquence manquante dans

les VEG des fractions 4 à 5 est présente dans les VEG des fractions 9 et 10. Ainsi, les fractions 4 à 5 contiennent une ou deux VEG tronquées au milieu de leur séquence, protéines qui n'ont jamais été identifiées jusqu'à présent. Ces protéines ont une masse moléculaire et une charge très différentes de la VEG connue. Dans les fractions 9 et 10, de masse moléculaire d'environ 18 kDa, la VEG pleine taille et l'OBP sont co-éluées (Figure 24-B).

Modifications	Masse théorique	Peptide	Masse observée	
OBP				
			Fraction 9	Fraction 10
PYRR:1	1711.7809	1-15	1711.5341 (1)	1711.5368 (1)
	1498.7424	16-28	1498.5523 (3)	1498.5970 (3)
	2888.4287	16-40		2888.3808 (2)
	1408.7041	29-40	1408.5139 (2)	1408.5139 (2)
MSO:39	1424.6991	29-40	1424.5020 (2)	1424.4477 (1)
	1197.5633	41-50	1197.3634 (1)	1197.4429 (1)
	1361.7099	48-58	1361.5230 (3)	1361.6237 (3)
	1017.5404	51-58	1017.4225 (3)	
	1539.7359	59-72	1539.7104 (3)	1539.6606 (3)
	1686.7354	73-87		1686.5198 (2)
	2613.2930	88-111	2613.0652 (3)	2613.2137 (3)
	933.5437	112-120	933.4702 (2)	933.3563 (2)
	2022.9978	121-137	2022.6606 (2)	2022.6055 (2)
Cys_CAM:155	2297.0714	138-157	2296.6929 (2)	2296.6874 (2)
VEG				
			Fraction 9	Fraction 10
PYRR:1	1750.9122	1-16	1750.7468 (2)	1750.8419 (2)
	1735.8723	17-31		1735.7567 (1)
	2351.2890	21-42	2350.9668 (1)	
	2960.5284	43-69		2960.5297 (1)
Cys_PAM:61	3088.6259	43-70	3088.4172 (3)	3088.1918 (3)
Cys_CAM:101	2323.1023	93-111	2323.0938 (3)	2322.9918 (3)
Cys_PAM:101	2109.9546	95-111	2110.0937 (2)	
	2287.1386	112-131		2286.8560 (2)
Cys_PAM:101	2440.1271	95-114	2439.8971 (3)	
	2412.2153	115-135	2411.9236 (1)	
	2186.0723	119-137		2185.9022 (1)
	2284.1350	136-157	2284.0372 (3)	
Cys_CAM:152	2341.1564	136-157		2341.1627 (2)

Tableau 3 : Cartographie peptidique des fractions 9 et 10 contenant l'OBP et la VEG en mélange. Entre parenthèses est indiqué le pourcentage d'acétonitrile avec lequel le peptide a été élué: 12% (1), 25% (2), 50% (3). PYRR:1, pyrrolidone carboxylic acid; Cys_CAM, carbamidomethyl cysteine; Cys_PAM, propionamido cysteine; MSO, methionine sulfoxide.

V. Immunodétection des modifications post-traductionnelles

Des échantillons identiques (même quantité) sont soumis à western-blot avec les anticorps spécifiques permettant de détecter les modifications post-traductionnelles. Nous avons montré précédemment que l'OBP et la VEG sont phosphorylées (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b; Chapitre 2), aussi les fractions ont été incubées avec les anticorps anti-phosphosérine, anti-phosphothréonine et anti-phosphotyrosine (Fischer Scientific) selon le protocole décrit dans Nagnan-Le Meillour *et al.* (2009b). Par ailleurs, la présence de *O*-GlcNac sur la VEG a été caractérisée dans le laboratoire (Le Danvic *et al.*, 2009). Ainsi, les mêmes fractions ont également été incubées avec deux anticorps spécifiques de la *O*-GlcNac, le RL2 (Fischer Scientific) et le CTD110.6 (Eurogentec), qui présentent des spectres de reconnaissance légèrement différents.

V. a. Phosphorylations

Seules les fractions 8, 8a, 9 et 10, contenant l'OBP et la VEG pleine taille sont marquées par les trois anticorps (Figure 26), alors que les fractions 4, 4a, 4b et 5 ne sont pas marquées. Ceci confirme les résultats obtenus avec l'extrait total (Figure 4 de l'article Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b). Ainsi, la bande de masse moléculaire proche de 15 kDa, visible dans l'extrait total, n'est pas marquée par ces anticorps (Figure 3 de l'article Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b). Il faut souligner que le western-blot avec ces anticorps donne toujours un bruit de fond élevé, malgré l'utilisation de BSA comme agent bloquant. Il est souvent nécessaire d'augmenter la concentration des anti-sérine et anti-thréonine (1/100) par rapport aux recommandations du fournisseur (1/500). Cependant, les résultats obtenus dans la Figure 26 montrent clairement que le marquage des fractions 8 à 10 n'est pas un artéfact, les fractions 4 à 5 ayant été utilisées en même quantité. Ces fractions constituent en quelque sorte un témoin négatif.

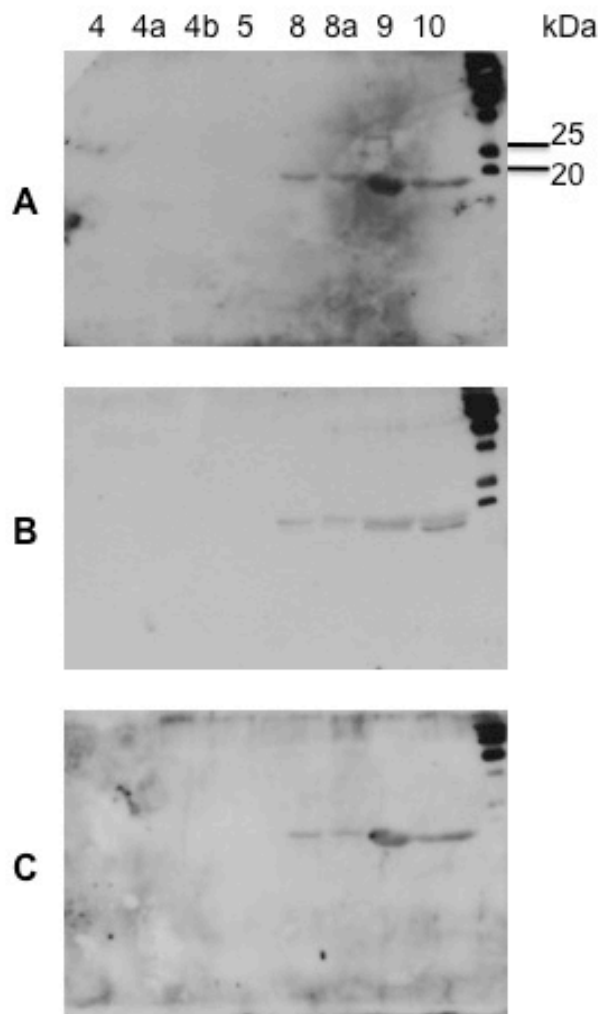


Figure 26 : Immunodétection des phosphorylations portées par les fractions séparées par HPLC. La même quantité des fractions 4, 4a, 4b, 5, 8, 8a 9 et 10 est déposée dans les puits (5 μ g). Les anticorps sont utilisés aux dilutions suivantes: A: anti-Ser, 1/100; B: anti-Thr, 3/1000; C: anti-Tyr, 1/100; anticorps secondaire, 1/40 000.

V. b. O-GlcNac

La présence de O-GlcNac a été recherchée en raison de l'identification d'une des isoformes de VEG modifiée par ce sucre (Le Danvic *et al.*, 2009). Cependant, comme pour les autres analyses, toutes les fractions ont été incubées avec deux types d'anticorps spécifiques de la O-GlcNac, le RL2 et le CTD110.6. Les fractions 8, 8a, 9 et 10 sont très immunoréactives aux deux anticorps, contrairement aux fractions 4 à 5 pour lesquelles on n'observe aucun marquage (Figure 27). Il faut noter que malgré la même quantité de protéine déposée dans les puits, la réaction aux anticorps se fait très fortement au CTD110.6 pour la fraction 9 et très fortement au RL2 pour la fraction 10. Ces deux fractions contiennent la VEG pleine taille, le fort marquage était donc attendu. Par contre, la cartographie peptidique n'a pas

permis de détecter de la VEG dans les fractions 8 et 8a, il semble donc que l'OBP soit aussi modifiée par la *O*-GlcNac.

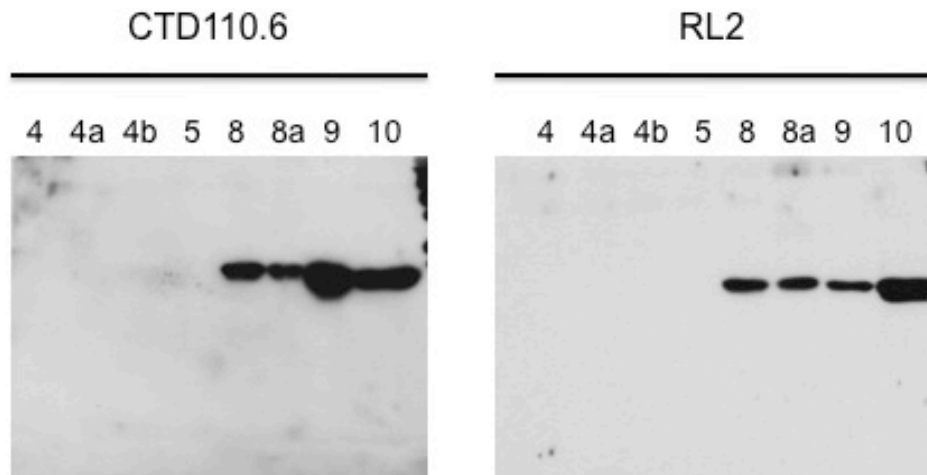


Figure 27 : Immunodétection de la présence de *O*-GlcNac dans les fractions séparées par HPLC. La même quantité des fractions 4, 4a, 4b, 5, 8, 8a 9 et 10 est déposée dans les puits (5 mg). Les anticorps sont utilisés aux dilutions suivantes: CTD110.6, 1/4 000; RL2, 1/2 000; anticorps secondaire, 1/30 000.

La spécificité du signal a été testée sur un extrait total de muqueuse respiratoire traité ou non à la β -hexosaminidase, puis soumis à western-blot avec l'anticorps RL2. Le marquage est supprimé après traitement à la β -hexosaminidase (Figure 28-B, +), alors que les protéines sont présentes (Figure 28-A) et non dégradées comme l'a montré la cartographie peptidique (données non montrées).

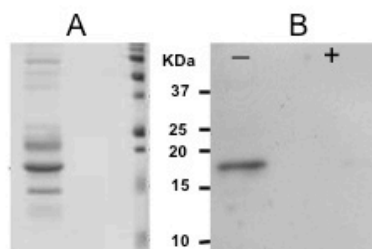


Figure 28 : Spécificité du marquage avec les anticorps RL2.
A : SDS-PAGE, coloration d'un extrait de MR au bleu de Coomassie; B : western-blot avec les anticorps RL2 (1/2 000, anticorps secondaires 1/30 000), avec (+) ou sans (-) traitement à la β -hexosaminidase.

VI. Localisation des sites de phosphorylation et de *O*-GlcNac

Les sites de phosphorylation et de glycosylation sont déterminés par la technique du BEMAD (mild Beta-Elimination followed by Michaël Addition of DTT) adaptée d'après Wells *et al.* (2002b). Le protocole est décrit en détail dans les publications du chapitre 2

(Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b) et du chapitre 3 (Brimau *et al.*, 2010). Cependant, le DTT confère aux peptides qui le portent une masse additionnelle de 136.2 Da ou des multiples de cette masse s'ils portent 2, 3 ou n DTT. Les cystéines ne sont pas réduites afin de ne pas y ajouter de DTT, les masses observées incrémentées de 136.2 Da ne correspondent qu'aux résidus Ser, Tyr et Thr modifiés.

Comme le montre la figure 24-B, les fractions 4, 4a, 4b et 5 sont collectées en très petite quantité. La majeure partie des collectes a servi aux western-blots et à la cartographie peptidique, et les échantillons restant n'ont pu être analysés pour localiser les sites de phosphorylation et de glycosylation. Ces analyses ont été effectuées sur les fractions 8, 8a, 9 et 10. Les spectres de masse obtenus par spectrométrie de masse MALDI-TOF sont présentés en Annexe 2.

VI. a. Cartographie des sites de phosphorylation

La fraction 8 contenant l'OBP seule (Tableau 2) est immunoréactive aux trois types d'anticorps anti-phosphorylations (Figure 26). Trois résidus sont phosphorylés (Tableau 4), Ser 41, Ser 57 et Thr 122, tandis que Ser 49 ou Tyr 52 sont potentiellement phosphorylés (1 DTT sur le peptide 45-55).

Masse calculée (Da)		Masse observée (M+H) ⁺	Peptide	Séquence peptidique
Non DTT	1 DTT			
1140.5354	1276.7354	1276.6440 (T+CT; 50%)	39-47	MRS(*)IEFDDK
1357.6634	1493.8634	1493.7390 (CT; 50%)	45-55	DDKES(°)KVY(°)LNF
1155.4986	1291.6986	1291.3486 (CT; 50%)	57-66	S(*)KENGICEEF
1262.5746	1398.7746	1398.5537 (T; 25%)	121-131	GT(*)DIEDQDLEK

*Tableau 4 : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 8 (SDS-PAGE) contenant l'OBP seule par BEMAD. * après Ser, Tyr ou Thr indique une addition de masse de 136.2 Da, indiquant la présence d'un groupement phosphate. ° après les mêmes résidus signale une phosphorylation potentielle. Entre parenthèse, sont indiqués les pourcentages d'acétonitrile avec lesquels les peptides sont élués et l'enzyme utilisée (T, trypsine; CT, chymotrypsine; T+CT, actions successives de la T et de la CT).*

L'analyse du BEMAD effectué sur **la fraction 8a** (Tableau 5) identifie 2 sites de phosphorylation sur l'OBP, Ser 41 et Thr 122.

Masse calculée (Da)		Masse observée (M+H) ⁺	Peptide	Séquence peptidique
0 DTT	1 DTT			
1140.5354	1276.7354	1276.5677 (T+CT; 50%)	39-47	MRS(*)IEFDDK
1262.5746	1398.7746	1398.5782 (T; 12.5%)	121-131	GT(*)DIEDQDLEK

Tableau 5 : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 8a (SDS-PAGE) contenant l'OBP seule par BEMAD. Même légende que pour le tableau 6.

La cartographie peptidique a révélé que l'OBP et la VEG pleine taille sont en mélange dans **les fractions 9 et 10** (Tableau 3). Comme pour l'analyse des protéines à partir de la migration d'un échantillon de MR totale (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b), l'attribution des peptides est certaine car l'OBP et la VEG ne partagent aucun peptide commun après digestion avec l'une ou l'autre enzyme (T ou CT), ou après actions successives des deux enzymes (T+CT).

Dans **la fraction 9**, immunoréactive aux trois types d'anticorps (Figure 26) sont présentes OBP et VEG pleine taille en mélange (Tableau 3). L'analyse des résultats du BEMAD (Tableau 6) indique pour l'OBP que 3 sites sont phosphorylés (Ser 23, Ser 24 et Ser 41), et que pour la VEG, 2 sites sont potentiellement phosphorylés, Thr 23 ou Ser 24.

Masse calculée (Da)			Masse observée (M+H) ⁺	Peptide	Séquence peptidique
Non DTT	1 DTT	2 DTT			
OBP					
1950.9807		2223.3807	2223.5032 (CT; 50%)	21-38	IGS(*)S(*)DLEKIGENAPFQVF
1140.5354	1276.7354		1276.8341 (T+CT; 25%)	39-47	MRS(*)IEFDDK
1355.6147			1355.6696 (CT; 25%)	57-68	<i>SKENGICEEFSL</i>
1686.7354			1686.7186 (T; 25%)	73-87	<i>QEGNTYDVNYAGNNK</i>
1738.8970			1738.4923 (T+CT; 25%)	138-152	<i>ENGIPEENIVNIER</i>
VEG					
1145.5507	1281.7507		1281.1447 (T+CT ; 25%)	21-31	AMT(°)S(°)DPEIPGK
1376.7532			1376.2374 (CT ; 25%)	128-139	<i>EEFKEVARAKGL</i>

*Tableau 6 : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 9 (SDS-PAGE) contenant l'OBP et la VEG pleine taille en mélange, par BEMAD. * après Ser, Tyr ou Thr indique une addition de masse de 136.2 Da, indiquant la présence d'un groupement phosphate. ° après les mêmes résidus signale une phosphorylation potentielle. Les peptides non phosphorylés sont en italiques. Entre parenthèse, sont indiqués les pourcentages d'acétonitrile avec lesquels les peptides sont élués et l'enzyme utilisée (T, trypsine; CT, chymotrypsine; T+CT, actions successives de la T et de la CT).*

Les résultats du BEMAD sur **la fraction 10** (Tableau 7) montrent deux sites de phosphorylation sur l'OBP, Ser 67 et Thr 71. Aucun peptide correspondant à la VEG n'a pu être détecté.

Masse calculée (Da)			Masse observée (M+H) ⁺	Peptide	Séquence peptidique
Non DTT	1 DTT	2 DTT			
OBP					
1539.7359	1812.1359	1812.1110 (T; 25%)	59-72	ENGICEEFS(*)LIGT(*)K	

*Tableau 7 : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 10 (SDS-PAGE) contenant l'OBP et la VEG pleine taille en mélange, par BEMAD. * après Ser, Tyr ou Thr indique une addition de masse de 136.2 Da, indiquant la présence d'un groupement phosphate. Entre parenthèse, est indiqué le pourcentage d'acétonitrile avec lequel le peptide est élué et l'enzyme utilisée (T, trypsine).*

VI. b. Cartographie des sites de O-GlcNac

Les fractions 8 et 8a contenant l'OBP seule, ainsi que les fractions 9 et 10 contenant l'OBP et la VEG pleine taille en mélange sont très immunoréactives aux anticorps spécifiques de la O-GlcNac, le RL2 et le CTD110.6 (Figure 27). En effet, les résultats du BEMAD indiquent sans ambiguïté que l'OBP comme la VEG pleine taille sont modifiées par la O-N-acétylglucosaminylation.

L'OBP contenue dans **la fraction 8** est glycosylée sur Ser13, Ser 41, Ser 49 et Thr 122 (Tableau 8).

Masse calculée (Da)		Masse observée (M+H) ⁺	Peptide	Séquence peptidique
0 DTT	1 DTT			
1711.7809	1847.9808	1847.4896 (T; 50%)	1-15	QEPQPEQDPFELS(*)GK
1140.5354	1276.7354	1276.5434 (T+CT ;50%)	39-47	MRS(*)IEFDDK
1357.6634	1493.8634	1493.7345 (CT; 50%)	45-55	DDKES(*)KVYLNK
1262.5746	1398.7746	1398.6817 (T; 50%)	121-131	GT(*)DIEDQDLEK

*Tableau 8 : Localisation des sites de O-N-acétylglucosaminylation de la fraction 8 (SDS-PAGE) contenant l'OBP par BEMAD. * après Ser ou Thr indique une addition de masse de 136.2 Da, indiquant la présence d'un groupement O-GlcNac. Entre parenthèse, sont indiqués les pourcentages d'acétonitrile avec lesquels les peptides sont élués et l'enzyme utilisée (T, trypsine; CT, chymotrypsine; T+CT, actions successives de la T et de la CT).*

Les résultats du BEMAD effectué sur **la fraction 8a** montrent que de nombreux peptides sont élués, indiquant une forte glycosylation de l'OBP. Ainsi, Ser 13, Ser 23, Ser 24, Ser 41, Ser 49, Ser 57, Ser 67, Thr 71 et Thr 122 sont modifiés par la O-GlcNac. Malgré

l'utilisation combinée de la trypsine et de la Chymotrypsine, il reste une ambiguïté quant à la modification de Thr 71 ou Thr 77. De plus, la présence de tyrosines modifiées dans les peptides 39-52, 69-78 et 73-82 est surprenante puisque ce résidu n'est pas modifié par la *O*-GlcNac. Il est très vraisemblable que la Tyr 78 et la Tyr 82 portant un groupement DTT proviennent d'une mauvaise digestion par la phosphatase alcaline avant le traitement par BEMAD. Ceci confirmerait que le traitement à la phosphatase alcaline ne permet pas d'obtenir une disparition de l'immunoréactivité des protéines en western-blot (Figure 4-A de l'article Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b).

Masse calculée (Da)				Masse observée (M+H) ⁺	Peptide	Séquence peptidique
Non DTT	1 DTT	2 DTT	3 DTT			
1914.8868	2051.0868			2051.8329 (CT; 25%)	1-16	QEPQPEQDPFELS(*)GKW
1950.9807	2087.1807			2087.3459 (CT; 25%)	21-38	IGS(°)S(°)DLEKIGENAPFQVF
1950.9807		2223.3807		2223.1854 (CT; 12.5%)	21-38	IGS(*)S(*)DLEKIGENAPFQVF
1762.8316			2171.4316	2170.9876 (CT; 25%)	39-52	MRS(*)IEFDDKES(*)KVV(*)
1361.7099				1361.7374 (T; 12.5%)	48-58	ESKVYLNFFSK
1155.4986	1291.6986			1291.6863 (CT; 50%)	57-66	S(*)KENGICEEF
1539.7359		1812.1359		1812.0705 (T; 12.5%)	59-72	ENGICEEFS(*)LIGT(*)K
1110.5426		1382.9426		1382.9887 (CT; 12.5%)	69-78	IGT(°)KQEGNT(°)Y(°)
1202.4960		1474.8960		1474.5683 (T+CT; 50%)	73-82	QEGNT(°)Y(°)DVNY(°)
1303.6376	1439.8376			1440.0637 (CT; 50%)	118-129	LGKGT(*)DIEDQDL
2224.1567				2224.4742 (T; 50%)	134-152	EVTRENGIPEENIVNIER

*Tableau 9 : Localisation des sites de O-N-acetylglucosaminylation de la fraction 8a (SDS-PAGE) contenant l'OBP par BEMAD. * après Ser ou Thr indique une addition de masse de 136.2 Da, indiquant la présence d'un groupement O-GlcNac. Entre parenthèse, sont indiqués les pourcentages d'acétonitrile avec lesquels les peptides sont élués et l'enzyme utilisée (T, trypsine; CT, chymotrypsine; T+CT, actions successives de la T et de la CT).*

La fraction 9, contenant l'OBP et la VEG pleine taille en mélange (Tableau 3) et très immunoréactive au CTD110.6 (Figure 27) contient de nombreux peptides glycosylés: l'OBP porte un groupement *O*-GlcNac sur les résidus Ser 23, Ser 24, Ser 41, Ser 49, Ser 57, Ser 67, Thr 71, Thr 122 et potentiellement Thr 77. La VEG est *O*-N-acetylglucosaminylée sur les acides aminés Thr 71, Thr 76 et Ser 91 (Tableau 10). Des peptides portant une tyrosine modifiée par le DTT sont également présents.

Masse calculée (Da)				Masse observée (M+H) ⁺	Peptide	Séquence peptidique
0 DTT	1 DTT	2 DTT	3 DTT			
OBP						
1950.9807		2223.3807		2223.3747 (CT; 25%)	21-38	IGS(*)S(*)DLEKIGENAPFQVF
1408.7041				1408.6475 (T; 50%)	29-40	<i>IGENAPFQVFM</i> R
1140.5354	1276.7354			1276.4266 (T+CT; 50%)	39-47	MRS(*)IEFDDK
983.4680		1255.8680		1256.2702 (T+CT; 12.5%)	45-52	DDKES(*)KVY(*)
1357.6634	1493.8634			1493.3268 (CT; 50%)	45-55	DDKES(°)KVY(°)LNF
1361.7099				1361.1495 (T; 12.5%)	48-58	<i>ESKVYLNFFSK</i>
2447.1395				2447.1648 (CT; 25%)	57-78	<i>SKENGICEEFLIGTKQEGNTY</i>
1017.5404		1289.9404		1289.6670 (T; 12.5%)	51-58	VY(*)LNFFS(*)K
1539.7359		1812.1359		1812.1811 (T; 12.5%)	59-72	ENGICEEFS(*)LIGT(*)K
1801.8603				1801.5043 (CT; 12.5%)	67-82	<i>SLIGTKQEGNTYDVNY</i>
1686.7354	1822.9354			1822.3604 (T; 12.5%)	73-87	QEGNT(*)YDVNYAGNNK
1141.5272	1277.7272			1278.2420 (CT; 12.5%)	79-88	DVNY(*)AGNNKF
1262.5746	1398.7746			1398.5256 (T; 50%)	121-131	GT(*)DIEDQDLEK
2853.4046				2853.6580 (CT; 25%)	133-157	<i>KEVTRENGIPEENIVNIERDDCP</i> <i>A</i>
2240.0499				2240.0959 (T; 25%)	138-157	<i>ENGIPEENIVNIERDDCPA</i>
VEG						
2960.5284				2960.6776 (T; 25%)	43-69	<i>ALEGGDLEAQITFLIDGQCQDVT</i> <i>LVLK</i>
1322.7467				1323.1401 (CT; 50%)	67-77	<i>VLKKTNPFTF</i>
982.4992		1254.8992		1254.2740 (T+CT; 12.5%)	70-77	KT(*)NQPFT(*)F
1074.6670	1210.8670			1211.3259 (T; 12.5)	84-92	RVVYILPS(*)K
918.5658		1190.9658		1190.9237 (T+CT; 12.5)	85-92	VVY(*)ILPS(*)K
1588.9097			1997.509 7	1997.3802 (CT; 25%)	88-100	ILPS(*)KVKDHY(*)ILY(*)
2266.0808				2266.3203 (T; 50%)	93-111	<i>VKDHYILYCEGELDGQEV</i> R
1376.7532				1376.1546 (CT; 25%)	128-129	<i>EEFKEVARAKGL</i>

Tableau 10 : Localisation des sites de O-N-acetylglucosaminylation de la fraction 9 (SDS-PAGE) contenant l'OBP et la VEG en mélange, par BEMAD. * après Ser ou Thr indique une addition de masse de 136.2 Da, indiquant la présence d'un groupement O-GlcNac. Les peptides non modifiés sont en italique. Entre parenthèse, sont indiqués les pourcentages d'acétonitrile avec lesquels les peptides sont élués et l'enzyme utilisée (T, trypsine; CT, chymotrypsine; T+CT, actions successives de la T et de la CT).

La fraction 10 est très immunoréactive aux anticorps RL2 et CTD110.6, avec un marquage plus important au RL2, contrairement à la fraction 9 qui est plus marquée par le CTD110.6. Le traitement des données de BEMAD confirme une forte glycosylation de l'OBP et de la VEG contenues dans cette fraction. Ser 41, Ser 49 et Thr 122 sont modifiés sur l'OBP, et Thr 71, Thr 76, Thr 78 sur la VEG. Sont potentiellement glycosylés, Thr 71 ou Thr 78 sur l'OBP, ainsi que Thr 23 ou Ser 24 sur la VEG. Comme pour les fractions 8a et 9, on observe des peptides portant des tyrosines modifiées par le DTT.

Masse calculée (Da)				Masse observée (M+H) ⁺	Peptide	Séquence peptidique
0 DTT	1 DTT	2 DTT	3 DTT			
OBP						
				2243.6432	29-47	<i>IGENAPFQVFMRSIEFDDK</i>
				(T; 25%)		
			2137.4802	2137.5006	40-53	RS(*)IEFDDKES(*)KVY(*)L
				(CT; 25%)		
		1255.8680		1255.5385	45-52	DDKES(*)KVY(*)
				(T+CT; 12.5%)		
		1382.9426		1382.7287	69-78	IGT(°)KQEGNT(°)Y(°)
				(CT; 25%)		
1141.5272	1277.7272			1277.8211	79-88	DVNY(*)AGNNKF
				(CT; 25%)		
2613.2930				2613.7009	88-111	<i>FVVSYASETALIISNINVDEEGDK</i>
				(T; 25%)		
1303.6376	1439.8376			1439.2875	118-129	LGKGT(*)DIEDQDL
				(CT; 25%)		
1303.6376				1303.1184	118-129	<i>LGKGTDIEDQDL</i>
				(CT; 25%)		
VEG						
				1441.3164	1-13	<i>QEFPAVGQPLQDL</i>
				(CT; 25%)		
1161.5456	1297.7456			1297.5629	21-31	AMT(°)S(°)DPEIPGK
				(T; 12.5%)		
854.4043		1126.8043		1126.7231	71-77	T(*)NQPFT(*)F
				(T+CT; 12.5%)		
810.4104		1082.8104		1082.0153	78-84	T(*)AY(*)DGKR
				(T+CT; 25%)		
1599.6777				1599.8531	100-112	<i>YCEGELDGQEVVM</i>
				(CT; 25%)		
1376.7532				1376.3149	128-139	<i>EEFKEVARAKGL</i>
				(CT; 25%)		

*Tableau 11 : Localisation des sites de O-N-acetylglucosaminylation de la fraction 10 (SDS-PAGE) contenant l'OBP et la VEG en mélange, par BEMAD. * après Ser ou Thr indique une addition de masse de 136.2 Da, indiquant la présence d'un groupement O-GlcNac. Les peptides non modifiés sont en italique. Entre parenthèse, sont indiqués les pourcentages d'acétonitrile avec lesquels les peptides sont élués et l'enzyme utilisée (T, trypsine; CT, chymotrypsine; T+CT, actions successives de la T et de la CT).*

VII. Propriétés de liaison des fractions étudiées par spectroscopie de fluorescence

L'étude des propriétés de liaison a été réalisée uniquement sur les fractions 8 à 10 en raison de leur importante quantité collectée (Figure 24), tandis que les fractions 4 à 5 n'ont pu être utilisées que pour la cartographie peptidique et les western-blots.

La spectroscopie de fluorescence permet d'étudier les propriétés de liaison des protéines avec les ligands. Cette technique est largement utilisée dans l'étude des propriétés de liaison des OBPs dans diverses espèces (Bovine : Ramoni *et al.*, 2001; 2002, Rat : Loëbel *et al.*, 1998; 2002, Porcine : Paolini *et al.*, 1999; Parisi *et al.*, 2003). Pour chaque fraction, nous avons réalisé dans un premier temps la titration de chaque protéine avec la sonde fluorescente 1-aminoanthracène (1-AMA) afin de déterminer les constantes de dissociation de chaque fraction pour la sonde. Le protocole de titration et des tests de compétition est décrit dans les articles Nagnan-Le Meillour *et al.* (2009a) et Brimau *et al.* (2010). L'OBP ne présente qu'un seul tryptophane en position 16 situé entre la cavité hydrophobe et l'extérieur de la protéine. Ainsi, il ne subit pas de changement de position à l'entrée des ligands, et la fluorescence intrinsèque de la protéine ne peut être utilisée. En excitant le système protéine/1-AMA à 295 nm, les spectres de fluorescence mesurés de chaque fraction indiquent une bande d'émission à 337 nm correspondant à la protéine et une autre bande d'émission à 484 nm pour l'1-AMA lié à la protéine. L'1-AMA libre en solution présente un maximum d'émission de fluorescence à 570 nm. Les tests de compétition sont réalisés par le déplacement de l'1-AMA lié à la protéine par des quantités croissantes de ligands. Lorsque le ligand présente une affinité pour la protéine, le ligand remplace la sonde dans la cavité hydrophobe, diminuant ainsi l'intensité de fluorescence de l'1-AMA à 484 nm. Dans le cas contraire l'1-AMA reste lié à la protéine et l'intensité du signal de fluorescence de la sonde reste inchangée. Des mesures de fluorescence pour différentes concentrations de ligands permettent alors de connaître la valeur de l'IC₅₀. Cette valeur correspond à la concentration du ligand nécessaire pour diminuer l'intensité de fluorescence de 50% de sa valeur initiale.

VII. a. Fixation de l'1-AMA par les protéines contenues dans les fractions 8 à 10

Pour chaque titration réalisée, des aliquots de la sonde fluorescente 1-AMA sont ajoutés en fonction de la concentration de la protéine. Les fractions 8 et 8a sont concentrées à

1 μM , tandis que les fractions 9 et 10 ont une concentration de 2,5 μM . Les spectres (présentés en Annexe 3) ont tous été normalisés en prenant comme référence la bande Raman de l'eau à 328 nm. De plus, le recouvrement des bandes de fluorescence à nécessité une décomposition spectrale de l'ensemble des spectres, afin d'obtenir les valeurs réelles de l'intensité de fluorescence de l'1-AMA dans la cavité hydrophobe à 484 nm. Les courbes de titration obtenues (Figure 29) par ajouts successifs de sonde fluorescente dans la solution protéique ont permis de calculer les valeurs de la constante de dissociation (K_d) des complexes formés pour les différentes fractions testées. La valeur du K_d de l'AMA pour les fractions 8, 8a, 9 et 10 a été calculée, et est respectivement, de $0,37 \pm 0,02 \mu\text{M}$, $0,23 \pm 0,02 \mu\text{M}$, $0,84 \pm 0,08 \mu\text{M}$ et $0,50 \pm 0,02 \mu\text{M}$.

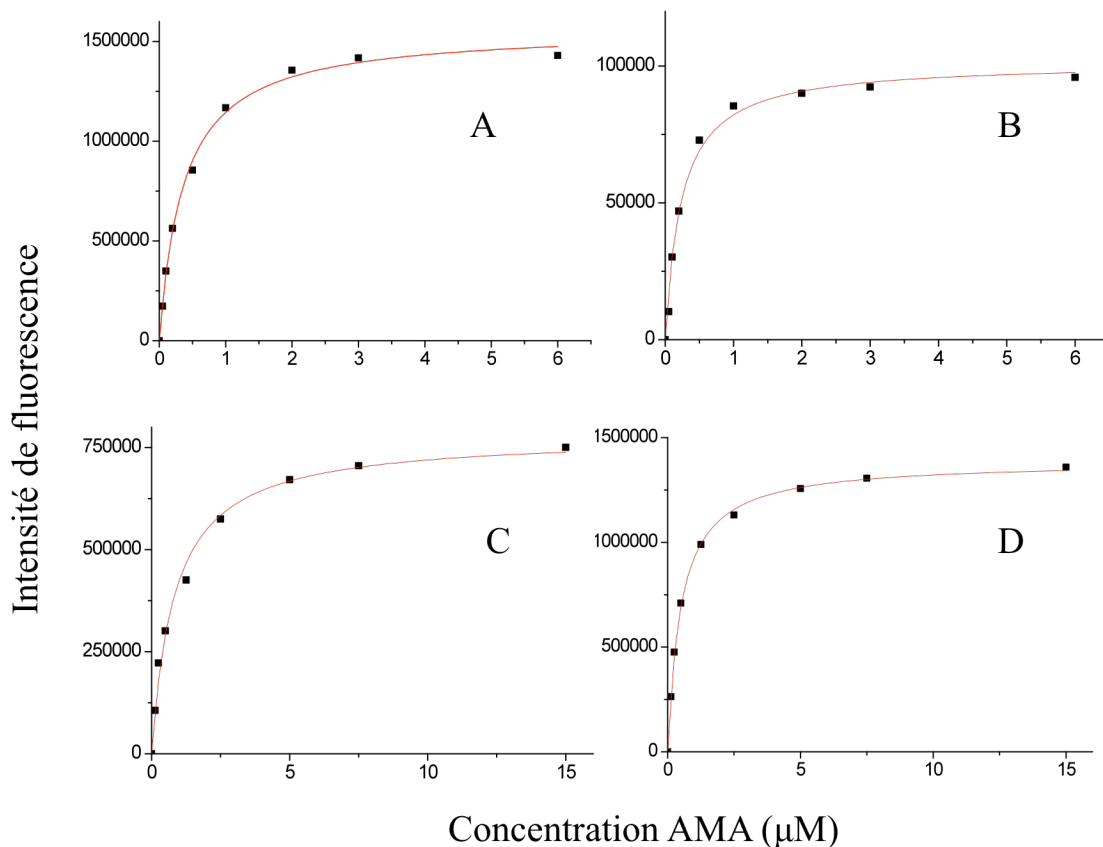


Figure 29 : Titration des fractions 8, 8a, 9 et 10 par l' 1-AMA. Courbes de titration de l'AMA pour les fractions (A : 8, B : 8a, C : 9 et D : 10) résultant de la mesure de la fluorescence à 484 nm en fonction de la concentration d'1-AMA de 0 à 6 μM pour les fractions 8 et 8a, et de 0 à 15 μM pour les fractions 9 et 10. Les fractions 8 - 8a sont à la concentration de 1 μM et les fractions 9 - 10 sont à la concentration de 2,5 μM .

VII. b. Déplacements de la sonde fluorescente

Les déplacements de la sonde fluorescente ont été réalisés avec les mêmes ligands que dans le Chapitre 3 (Brimau *et al.*, 2010) : les composés de la phéromone sexuelle du verrat (androsténone et androstérol), les acides gras de la SAP (acide palmitique et myristique) et la testostérone, ligand naturel de la VEG, qui constitue le témoin négatif pour l'OBP.

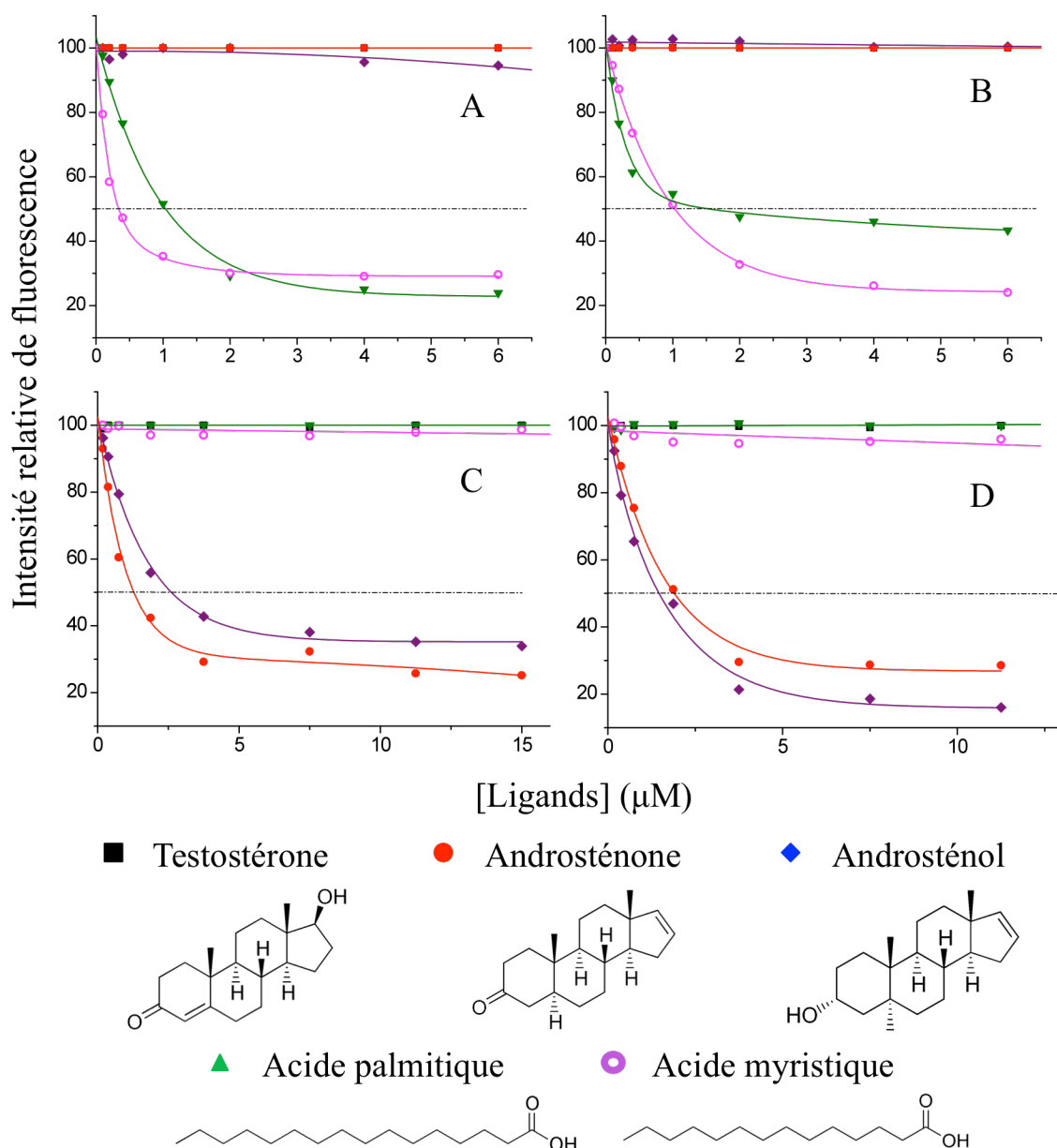


Figure 30 : Courbes de compétition entre l'1-AMA lié aux protéines et les cinq ligands. Les fractions 8 (A) et 8a (B) sont utilisées à une concentration de 1 μM et saturées avec 2 μM d'1-AMA. Les ligands sont ajoutés en concentrations croissantes de 0 à 6 μM. Les fractions 9 (C) et 10 (D) sont utilisées à une concentration de 2,5 μM et saturées avec 3,75 μM d'1-AMA. Les Ligands sont ajoutés en concentrations croissantes de 0 à 15 μM.

Les acides gras, l'acide palmitique et l'acide myristique, déplacent l'1-AMA dans les tests de compétition pour les fractions 8 et 8a, alors que l'androstérol et l'androsténone, ne

présentent aucune affinité pour ces fractions (Figure 30). Les résultats sont inversés pour les fractions 9 et 10. En effet, l'androsténol et l'androsténone déplacent la sonde alors que l'intensité de fluorescence de l'1-AMA ne change pas pour les acides gras. Les fractions 9 et 10 ont une affinité pour les stéroïdes sexuels tandis que les fractions 8 et 8a ont une meilleure affinité pour les composés de la SAP (acide palmitique et acide myristique).

Le Tableau 12 récapitule les constantes d'affinité obtenues entre chaque fraction et les différents ligands. Ainsi l'acide myristique (0,05 μM) a une affinité plus grande que l'acide palmitique (0,16 μM) pour la fraction 8. Pour la fraction 8a, l'affinité pour les deux acides gras est pratiquement équivalente. L'androsténone (0,49 μM) a une affinité plus grande que l'androsténol (0,23 μM) pour la fraction 9. L'affinité de la fraction 10 est pratiquement identique pour les deux ligands.

ligands	Fraction 8		Fraction 8a		Fraction 9		Fraction 10	
	IC ₅₀ (μM)	Kd (μM)	IC ₅₀ (μM)	Kd (μM)	IC ₅₀ (μM)	Kd (μM)	IC ₅₀ (μM)	Kd (μM)
Testostérone	-	-	-	-	-	-	-	-
Androsténone	-	-	-	-	1.28	0.23	1.89	0.22
Androsténol	-	-	-	-	2.59	0.49	1.43	0.16
Acide palmitique	1.03	0.16	1.51	0.16	-	-	-	-
Acide myristique	0.33	0.05	1.03	0.11	-	-	-	-

Tableau 12 : Valeurs des IC₅₀ et des constantes de dissociation calculées relatives aux tests de liaison par déplacement.

La testostérone n'est liée par aucune des fractions. Ce résultat était attendu pour les fractions 8 et 8a ne contenant que l'OBP. Par contre, la cartographie peptidique (Tableau 3) a montré que les fractions 9 et 10 sont constituées d'un mélange d'OBP et de VEG. On pouvait donc attendre une liaison de la testostérone avec les fractions 9 et/ou 10. Ce résultat surprenant indique que la quantité de VEG contenue dans les fractions doit être très faible. Afin de le vérifier, nous avons analysé la teneur protéique de ces fractions par électrophorèse en conditions natives (PAGE).

VII. c. Analyse de la composition des fractions 9 et 10 par PAGE

L'OBP et la VEG ont des masses moléculaires voisines (17 689 Da et 17 444 Da) et co-migrent dans la même bande en SDS-PAGE (Figure 1-B de l'article Nagnan-Le Meillour

et al., 2009b, Chapitre 2). Par contre, elles sont très bien séparées lorsqu'on fait migrer l'extrait de muqueuse respiratoire les contenant en conditions natives (protocole décrit dans ce même article, Figure 1-A). Les fractions 9 et 10, après HPLC, sont désalées (Vivaspin 5, 3 kDa, Sartorius) par centrifugation, puis séchées pour être reprises dans le tampon d'échantillon. La même quantité de muqueuse respiratoire est déposée sur le gel comme témoin. Ainsi, logiquement, on doit retrouver la même quantité d'OBP et de VEG que dans l'extrait total de MR.

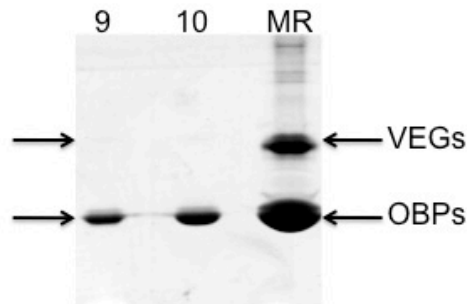


Figure 31 : Electrophorèse en conditions natives (PAGE) des fractions 9 et 10. La position des isoformes d'OBP et de VEG est indiquée (d'après la cartographie peptidique décrite dans l'article Nagnan-Le Meillour et al., 2009b, Chapitre 4). 9, fraction 9; 10, fraction 10, MR, muqueuse respiratoire.

Or, il apparaît sur le gel Figure 31 qu'une importante quantité de protéine est perdue au cours de la séparation des protéines par HPLC, puis au cours du traitement pour enlever le NaCl. Mais proportionnellement, l'OBP est moins affectée par ces traitements. Il est probable que la VEG soit presque totalement retenue sur la colonne échangeuse d'anions et qu'elle ne soit pas éluée, même avec une concentration d'1 M de NaCl. Une très faible bande au niveau de la VEG est visible sur le gel original (flèche). Ainsi, les fractions 9 et 10 sont presque exclusivement constituées d'OBP, ce qui explique l'absence de liaison avec la testostérone.

Discussion

I. Comparaison des patrons de phosphorylation des OBP natives et recombinantes

Les résultats du Chapitre 2 et du Chapitre 3 ont mis en évidence les différences de phosphorylation entre protéines natives et protéines recombinantes. La première conclusion est que les cellules eucaryotes hétérologues, telles que les cellules de levure et les cellules de la lignée CHO, ne greffent pas les phosphorylations exactement sur les mêmes sites que les cellules glandulaires de porc. Cependant, l'analyse par spectrométrie de masse des peptides générés lors du protocole expérimental de BEMAD introduit un biais important, inhérent à la méthode. En effet, l'analyse par MALDI-TOF d'un mélange de peptides révèle les pics majoritaires et "écrase" les pics minoritaires. Ainsi, un peptide qui sera peu abondant pourra ne pas être détecté lors d'une analyse. De plus, l'hydrophobicité des peptides varie et nous a conduits à utiliser différents pourcentages d'acétonitrile pour assurer leur élution. Ceci nous a permis d'obtenir des cartes peptidiques avec des recouvrements de 100% pour l'OBP, ce qui est très rare, les protéomistes se contentant souvent de 30 à 40% de recouvrement de séquence pour identifier une protéine. Mais dans le cas de l'identification des sites de phosphorylation, il s'avère que les peptides phosphorylés sont en moindre quantité que les peptides non phosphorylés (Mann *et al.*, 2002), comme en témoigne la présence de peptides non phosphorylés après élution sur les colonnes thiol. Par ailleurs, la comparaison des patrons de phosphorylation entre forme totale native (Chapitre 2) et isoformes natives (Chapitre 4) doit être faite avec précaution. En effet, les isoformes natives sont considérablement enrichies par la purification par HPLC et l'addition de plusieurs collectes pour chaque fraction. Le BEMAD est toujours effectué sur la même quantité de protéine, limitée au dépôt de 5-10 µg par puits en SDS-PAGE, donc une fraction ne représentant que le 1/10ème de l'OBP totale (Chapitre 2) sera 10 fois plus concentrée lors de l'analyse de chaque isoforme (Chapitre 4). Il s'ensuit que des sites de phosphorylation peuvent être révélés par l'analyse des isoformes et masqués lors de l'analyse de l'OBP totale.

Le tableau 13 présente la cartographie des sites de phosphorylation effectuée sur l'OBP native totale (Chapitre 2), l'OBP totale recombinante produite en *P. pastoris* et les deux isoformes correspondantes (Chapitre 3) et les isoformes d'OBP native (Chapitre 4), auxquelles est jointe l'isoforme produite par les cellules CHO.

Totale MR	Fraction 8	Fraction 8a	Fraction 9	Fraction 10	OBP-Pichia	OBP-iso2	OBP-iso3	OBP-CHO
Ser 13					Ser 13	Ser 13	Ser 13	Ser 13
Ser 23			Ser 23		Ser 23	Ser 23		
Ser 24			Ser 24		Ser 24	Ser 24		
Ser 41	Ser 41	Ser 41	Ser 41		Ser 41	Ser 41	Ser 41	<i>Ser 41</i>
Ser 49	Ser 49				Ser 49	Ser 49		<i>Ser 49</i>
Tyr 52					Tyr 52	Tyr 52	Tyr 52	
Ser 57	Ser 57				Ser 57	Ser 57	Ser 57	Ser 57
<i>Ser 67</i>				Ser 67	Ser 67	Ser 67	Ser 67	
<i>Thr 71</i>				Thr 71	Thr 71	Thr 71	Thr 71	
					<i>Thr77</i>	<i>Thr77</i>	<i>Thr77</i>	
					Tyr 78	<i>Tyr 78</i>	Tyr 78	
Tyr 82					Tyr 82	<i>Tyr 82</i>	Tyr 82	
					<i>Ser 91</i>		<i>Ser 91</i>	<i>Ser 91</i>
					<i>Tyr 92</i>		<i>Tyr 92</i>	<i>Tyr 92</i>
					<i>Ser 94</i>		<i>Ser 94</i>	<i>Ser 94</i>
					<i>Thr 96</i>		<i>Thr 96</i>	<i>Thr 96</i>
					<i>Ser 101</i>		<i>Ser 101</i>	<i>Ser 101</i>
					Thr 112	<i>Thr 112</i>	Thr 112	<i>Thr 112</i>
					Thr 115	<i>Thr 115</i>	Thr 115	
Thr 122	Thr122	Thr122						Thr 122
					Thr 136	Thr 136		

Tableau 13: Cartographie des phosphorylations des différentes formes d'OBP étudiées dans ce travail: Totale MR, OBP totale de la muqueuse respiratoire (Chapitre 2, Nagnan-Le Meillour et al., 2009b); Fraction 8 à fraction 10, isoformes natives séparées par HPLC (Chapitre 4); OBP-Pichia, forme totale d'OBP recombinante produite par *P. pastoris* (Chapitre 3, Brimau et al., 2010); OBP-iso2, isoforme 2 d'OBP recombinante produite par *P. pastoris* (Chapitre 3); OBP-iso3, isoforme 3 d'OBP recombinante produite par *P. pastoris* (Chapitre 3); OBP-CHO, isoforme d'OBP produite par la lignée cellulaire CHO (Chapitre 3). Les phosphorylations potentielles (localisations ambiguës) sont indiquées en italique.

La comparaison des phosphorylations entre les l'OBP natives, l'OBP recombinante produite par la levure et les isoformes de l'une et l'autre, montre clairement que les protéines recombinantes sont hyperphosphorylées par rapport aux protéines natives. Ces phosphorylations supplémentaires sont localisées à partir de la Thr 77, sur la deuxième partie de la séquence primaire de l'OBP. L'ajout de MPT surnuméraires sur les protéines exprimées par les cellules de levure a été rapporté pour les N-glycosylations (pour revue, voir Daly & Hearn, 2005). Ainsi, les chaînes glycaniques formées par la levure sont composées d'oligomannoses, de 3 à 13 pour *P. pastoris*, jusqu'à 40 pour *Saccharomyces cerevisiae* ajoutés aux O-GlcNac greffées sur les résidus Asn. Ce phénomène semble lié à un transit plus long de la protéine en cours de biosynthèse dans le reticulum endoplasmique (Shelikoff *et al.*, 1996). Pour la O-glycosylation, certaines protéines peuvent être glycosylées par la levure, alors que la protéine native ne l'est pas (Gellissen, 2000) et on observe également une

hyperglycosylation en général (Letourneur *et al.*, 2001). Par contre, la phosphorylation de protéines eucaryotes chez la levure n'a pas été étudiée (Daly & Hearn, 2005), mais notre étude tend à montrer que la levure pourrait aussi hyperphosphoryler les protéines. Sur la première partie de la séquence primaire, les phosphorylations sont identiques sur les formes totales d'OBP native et d'OBP recombinante (Ser 13, Ser 23, Ser 24, Ser 41, Ser 49, Tyr 52, Ser 57, Ser 67 et Ser 71). Il y a plus de sérines phosphorylées que de tyrosines ou de thréonines, ce qui est cohérent avec les données statistiques concernant le ratio pSer:pThr:pTyr de 1800:200:1 des cellules eucaryotes reportées par Mann *et al.* (2002). Le nombre élevé de sérines phosphorylées explique que le plus fort marquage a toujours été observé avec les anticorps anti-phosphosérine dans nos western-blots.

La comparaison entre la forme native totale et les 4 fractions qui en sont issues montre que les différents sites phosphorylés dans la forme totale se retrouvent distribués dans les quatre fractions. En effet, chaque fraction comporte au maximum 4 phosphorylations, contre 11 phosphorylations pour la forme globale. Certains sites occupés dans la forme totale sont dépourvus de phosphate dans les 4 fractions (Ser 13, Tyr 52 et Tyr 82). La cause en est peut-être la méthode de purification utilisée qui comporte des limites quant à la séparation et à la récupération des différentes isoformes. L'exemple le plus démonstratif est celui de la VEG pleine taille, dont une quantité très faible seulement est éluée de la colonne, et pour laquelle la cartographie des sites de phosphorylation est difficile. Ainsi, si une isoforme d'OBP est minoritaire et/ou a des propriétés physico-chimiques qui empêchent son élution dans les conditions utilisées, il est impossible de la détecter. Ce peut être le cas des isoformes portant Ser 13, Tyr 52 et Tyr 82, puisqu'aucun peptide ne portant ces modifications n'a été détecté. Ces isoformes sans doute très minoritaires ont peut-être été éluées dans les fractions dont le contenu protéique n'a pu être mis en évidence par la technique de coloration utilisée (fractions 2, 3, 6 et 7, Figure 24). Les résultats de BEMAD obtenus sur les 4 fractions majoritaires d'OBP ne révèlent pas la présence de mélange d'isoformes dans chaque fraction, sous la forme du même peptide diversement phosphorylé, comme c'était le cas pour la forme native totale (Chapitre 2). Nous pouvons en déduire que chaque fraction peut correspondre à une isoforme homogène. Par contre, toutes les isoformes d'OBP n'ont peut-être pas été détectées par cette méthode.

On peut exclure de l'interprétation la variabilité due aux échantillons puisque les mêmes aliquots ont été utilisés pour l'analyse des protéines totales (Chapitre 2) et la purification des isoformes par HPLC (Chapitre 4), avec un mode d'extraction et un traitement similaires.

II. Le rôle de la phosphorylation et de la glycosylation dans les propriétés de liaison de l'OBP

Jusqu'à cette étude, aucun mécanisme pouvant expliquer le rôle des OBP dans la discrimination des odeurs n'a été proposé. Le manque de diversité de ces protéines dans chaque espèce a conduit les auteurs à limiter le rôle des OBP à celui de solubilisateur et de transporteur passif des molécules odorantes (Tegoni *et al.*, 2000). Pourtant quelques études ont suggéré que des isoformes de séquence primaire pouvaient avoir des spectres de liaison différents : par exemple, l'OBP-1 de rat se lie préférentiellement aux hétérocycles, l'OBP-2 aux longues chaînes carbonées des acides gras et des aldéhydes, alors que l'OBP-3 se lie aux cycles, saturés ou non (Loëbel *et al.*, 2002).

La mise en évidence des phosphorylations de l'OBP porcine (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b; Brimau *et al.*, 2010) a permis de jeter un éclairage différent sur la diversité des formes d'OBP au sein d'un même animal et sur leurs propriétés de liaison. La séparation des protéines par HPLC s'est révélée un outil puissant pour étudier ces propriétés de liaison par spectroscopie de fluorescence, en adaptant les conditions d'analyse aux quantités obtenues. Ce type de travail n'est pas réalisable sur tous les modèles animaux, il est pour l'instant irréalisable chez les insectes ou les petits animaux modèles habituellement utilisés en Olfaction, tels que la souris ou le rat. Ainsi, si le porc a été choisi car il est un modèle agronomique d'intérêt majeur, il s'est révélé un modèle de choix pour l'étude biochimique du rôle des OBP.

Ligands	Isoformes natives				Isoformes <i>P. pastoris</i>	
	OBP-iso8	OBP-iso8a	OBP-iso9	OBP-iso10	OBP-iso2	OBP-iso3
Testostérone	–	–	–	–	–	–
Androsténone	–	–	0.23	0.22	1.00	0.30
Androsténol	–	–	0.49	0.16	0.60	0.20
A. palmitique	0.16	0.16	–	–	0.20	–
A. myristique	0.05	0.11	–	–	0.20	0.50

Tableau 14 : Affinité (exprimée par le K_d en μM) des différentes isoformes d'OBP pour les stéroïdes sexuels et les composants de la SAP.

Le Tableau 14 récapitule ces résultats. La première remarque est que l'affinité entre isoformes et ligands est plutôt de l'ordre du nanomolaire que du micromolaire, contrairement à ce qui a été obtenu par d'autres auteurs (Paolini *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2008) sur les formes

non purifiées, natives ou recombinantes. La deuxième remarque est que les isoformes présentent une forte discrimination vis à vis des ligands testés. L'isoforme recombinante OBP-iso 2 a plus d'affinité pour les acides palmitique et myristique, tandis que l'OBP-iso3 a plus d'affinité pour les stéroïdes androsténol et androsténone, et ne lie pas l'acide palmitique. Dans le cas des protéines recombinantes, on observe donc plutôt des affinités graduelles, plus ou moins fortes pour tel ou tel composé. Or, dans le cas des isoformes natives, les propriétés de liaison vis à vis des mêmes molécules sont radicales : les isoformes 8 et 8a lient les acides gras et pas les stéroïdes, alors que les isoformes 9 et 10 ne lient que les stéroïdes.

Ces propriétés de liaison reflètent la nature des isoformes : les isoformes recombinantes sont encore hétérogènes en termes de phosphorylation, comme l'a montré le BEMAD (Brimau *et al.*, 2010), alors que les isoformes natives semblent homogènes (Chapitre 4, paragraphe VI. a). On peut conclure que la spécificité de liaison d'une isoforme est d'autant plus grande que sa composition est homogène. En effet, dans le cas d'un mélange d'isoformes, le Kd mesuré représente une moyenne des Kd des différentes formes et masque donc les spécificités de liaison éventuelles.

Il est tentant de relier ces différences d'affinité à des patrons de phosphorylation différents. C'est ce qui a été fait dans l'article Brimau *et al.* (2010) pour les isoformes recombinantes, en supposant que la seule différence entre les isoformes réside dans les patrons de phosphorylation. Or, nous savons à l'issue de ce travail que l'OBP est également modifiée par la *O*-GlcNac. Ces données doivent donc être interprétées à la lueur des deux types de modifications post-traductionnelles mises en évidence pour l'OBP, glycosylation et phosphorylation.

Les sites de phosphorylation et de *O*-GlcNac n'ont été localisés que pour les quatre isoformes purifiées par HPLC à partir de l'OBP native de la muqueuse respiratoire. Pour la cartographie des sites de *O*-GlcNac, nous avons obtenu des peptides dont la masse suggère que des tyrosines portent un groupement DTT, ce qui ne peut être du à la présence d'une *O*-GlcNac sur ce résidu. Force est donc de constater que le traitement à la phosphatase alcaline pour éliminer les phosphates au préalable de la β -élimination n'est pas totalement efficace. Nous l'avions d'ailleurs suggéré dans l'article Nagnan-Le Meillour *et al.* (2009b), car le marquage lié aux anticorps spécifiques anti-phosphorylations ne disparaît jamais totalement après traitement avec cette enzyme (Figure 4-A de cet article). Au contraire, le marquage RL2 disparaît totalement après traitement à la β -hexosaminidase (Chapitre 4, Figure 28). Si des molécules de DTT ont pu se fixer sur les tyrosines, elles ont très bien pu se fixer aussi sur d'autres résidus Ser ou Thr, rendant nos résultats incertains quant à la localisation des sites de

O-GlcNac et donc préliminaires. Nous pouvons cependant, ces précautions évoquées, analyser les résultats de cartographie exposés dans le Tableau 15.

OBP-iso8		OBP-iso8a		OBP-iso9		OBP-iso10	
Phospho	GlcNac	Phospho	GlcNac	Phospho	GlcNac	Phospho	GlcNac
	Ser 13		Ser 13				
			Ser 23	Ser 23	Ser 23		
			Ser 24	Ser 24	Ser 24		
Ser 41	Ser 41	Ser 41	Ser 41	Ser 41	Ser 41		Ser 41
Ser 49	Ser 49		Ser 49		Ser 49		Ser 49
Ser 57			Ser 57		Ser 57		
			Ser 67		Ser 67	Ser 67	
			Thr 71		Thr 71	Thr 71	Thr 71 /Thr 78
Thr 122	Thr 122	Thr 122	Thr 122		Thr 122		Thr 122

Tableau 15 : Récapitulatif des sites de phosphorylation et de *O*-GlcNac identifiés par la technique du BEMAD. Les sites potentiels de Yin Yang sont indiqués en rouge.

Aucun site n'est occupé par la *O*-GlcNac sur d'autres résidus que ceux qui ont été identifiés comme phosphorylés, hormis la Ser 13, qui est phosphorylée dans la forme native totale. Plusieurs sites de Yin Yang ont été mis en évidence, correspondant à un résidu qui peut être alternativement occupé par un groupement phosphate ou un groupement *O*-GlcNac : Ser 41, Ser 49 et Thr 122 pour l'OBP-iso8, Ser 41 et Thr 122 pour l'OBP-iso8a, Ser 23, Ser 24 et Ser 41 pour l'OBP-iso 9 et Thr 71 pour l'OBP-iso10. Au contraire, certains sites modifiés par la *O*-GlcNac ne semblent pas phosphorylés (par exemple Thr 122 dans les OBP-iso9 et OBP-iso10). Si l'on rapproche les données de cartographie et les données de spectroscopie de fluorescence, il apparaît que la grande différence entre les isoformes 8-8a et 9-10 provient en partie de l'association de sites Yin Yang différents : Ser 41, Ser 49 et Thr 122 pour les formes 8 et 8a, Ser 23, Ser 24, Ser 41 et Thr 71 pour les formes 9 et 10. L'affinité remarquable de l'isoforme OBP-iso8 pour l'acide myristique ($K_d=0.05 \mu\text{M}$, Tableau 14) peut ainsi être reliée au site de Yin Yang sur la Ser 49, seule différence entre les deux isoformes OBP-iso8 et OBP-iso8a. Ainsi, même si ces données méritent d'être confirmées, elles nous permettent de relier des propriétés de liaison différentes à des patrons de MPT différents. Les données sur les sites de *O*-GlcNac remettent en cause l'homogénéité des quatre isoformes obtenues par HPLC. En

effet, la présence alternative d'un groupement phosphate ou d'un groupement *O*-GlcNac accroît sensiblement le nombre d'isoformes théoriques contenues dans chaque fraction. De plus, comme le groupement *O*-GlcNac n'est pas chargé, les isoformes identiques pour les phosphorylations mais portant des *O*-GlcNac sur des sites différents seront éluées dans les mêmes fractions par HPLC en échange d'anions. Il reste donc beaucoup de travail avant de pouvoir obtenir des formes homogènes, dans des quantités suffisantes pour effectuer des tests de liaison par spectroscopie de fluorescence, et caractériser les spécificités de liaison de chaque isoforme.

III. La VEG

Les résultats des tests de liaison ont montré qu'aucune isoforme d'OBP, qu'elle soit native ou recombinante, n'a d'affinité pour la testostérone (Tableau 14). Ce résultat confirme la grande spécificité d'interaction entre la VEG1 modifiée par la *O*-GlcNac et la testostérone (Le Danvic *et al.*, 2009). Il est intéressant aussi de constater que les données immunologiques confirment de façon très claire la présence de *O*-GlcNac sur une (ou des) isoforme (s) de VEG, qui avait été caractérisée avec des moyens chimiques, par β -élimination suivie de l'analyse des sucres par GC-MS (Le Danvic *et al.*, 2009). De plus, cette étude a permis de localiser des sites potentiels de *O*-GlcNac sur la VEG, en plus des phosphorylations attendues de l'analyse de la forme totale native (Chapitre 2). Ces données sont présentées dans le Tableau 16.

VEG Fraction 9		VEG Fraction 10	
Phospho	GlcNac	Phospho	GlcNac
Thr 23/Ser 24			Thr 23/Ser 24
	Thr 71		Thr 71
	Thr 76		Thr 76
			Thr 78
	Ser 91		

Tableau 16: Récapitulatif des sites de MPT localisés sur la séquence primaire de la VEG contenue dans les fractions 9 et 10

Très peu de sites de phosphorylations ont pu être détectés sur les deux fractions, alors que 9 sites ont été mis en évidence sur la forme totale qui n'a pas été soumise à l'HPLC, mais analysée à partir du gel SDS-PAGE (Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b, Chapitre 2). La VEG

pleine taille n'a donc pas été éluée de la colonne échangeuse d'anions, suggérant une forte affinité pour celle-ci. Etant donné que la VEG et l'OBP sont très bien séparées en conditions natives (Figure 31), une électrophorèse PAGE, suivie d'électroélution (D-Tube Dializer, VWR) des bandes contenant les VEG pourrait permettre d'obtenir des quantités compatibles avec le BEMAD.

Seules la Thr 23 ou la Ser 24 de la VEG sont détectées comme portant un groupement phosphate dans la fraction 9. Le BEMAD sur VEG totale (Tableau 2 de l'article Nagnan-Le Meillour *et al.*, 2009b) indiquait que le peptide 21-31 existe sous deux formes, avec soit la Thr 23, soit la Ser 24 phosphorylées, soit les deux. Un site de *O*-GlcNac est localisé soit sur la Thr 23 soit sur la Ser 24 de la VEG de la fraction 10. Ces données peuvent indiquer un site de Yin Yang sur l'un ou l'autre de ces résidus ou sur les deux, suggérant que la fraction 9 contient l'isoforme phosphorylée et la fraction 10 l'isoforme glycosylée. Les autres sites identifiés comme porteurs de *O*-GlcNac sont à confirmer lorsque de plus grandes quantités de VEG pourront être obtenues.

L'intérêt majeur de ce travail concernant la VEG est la mise en évidence de formes tronquées qui ne semblent ni phosphorylées, ni glycosylées (western-blots, Figures 26 et 27), au contraire de la VEG pleine taille. La cartographie peptidique a montré que deux isoformes de séquence primaire tronquée sont contenues dans les fractions 4 et 4a, et 4b et 5 respectivement. L'isoforme des fractions 4 et 4a est tronquée de 38 acides aminés en position interne, et que l'isoforme des fractions 4b et 5 est tronquée de 28 résidus également en position interne. La position des résidus manquant exclue toute possibilité de dégradation protéolytique, soit N-terminale, soit C-terminale conduisant à une forme de masse moléculaire inférieure à celle attendue. Ainsi, ces isoformes de masse comprise entre 15 et 15,3 kDa semblent issues de l'épissage alternatif du gène codant la VEG. Sur la Figure 32, les acides aminés correspondant aux exons ont été positionnés par homologie avec la structure du gène codant l'homologue humain de la VEG, la TL (www.ensembl.org, gène LCN1, réf. ensembl ENSG00000160349). En effet, la séquence génomique du gène codant la VEG est disponible (Gene ID U96150), mais pas annotée. Le gène contient 7 exons séparés par 6 introns. L'exon 1 est à moitié non codant et à moitié codant, et l'exon 7 ne contient pas de séquence codante. La partie manquante se situe dans l'exon 2 et l'exon 3. Le peptide signal fait partie de l'exon 1, mais il n'est peut-être pas identique à celui de la séquence pleine taille, aussi il n'est pas reporté sur la séquence. La protéine est sécrétée, aussi il est vraisemblable que son ARNm mature comporte un peptide signal. A cet égard, l'absence de phosphorylation et de *O*-GlcNac sur la séquence de VEG tronquée suggère que sa biosynthèse diffère de celle

de la VEG pleine taille. En effet, sur la forme totale native, parmi les sites de phosphorylation, seule la Thr 54 se trouve sur la partie de séquence manquante. Les autres phosphorylations se trouvent sur les parties N- et C-terminales communes à toutes les isoformes. L'absence de MPT n'est donc pas due à l'absence des sites de phosphorylation. L'explication est plutôt à rechercher du côté de la régulation post-transcriptionnelle, au niveau de la maturation des ARNm, selon un mécanisme encore inconnu.

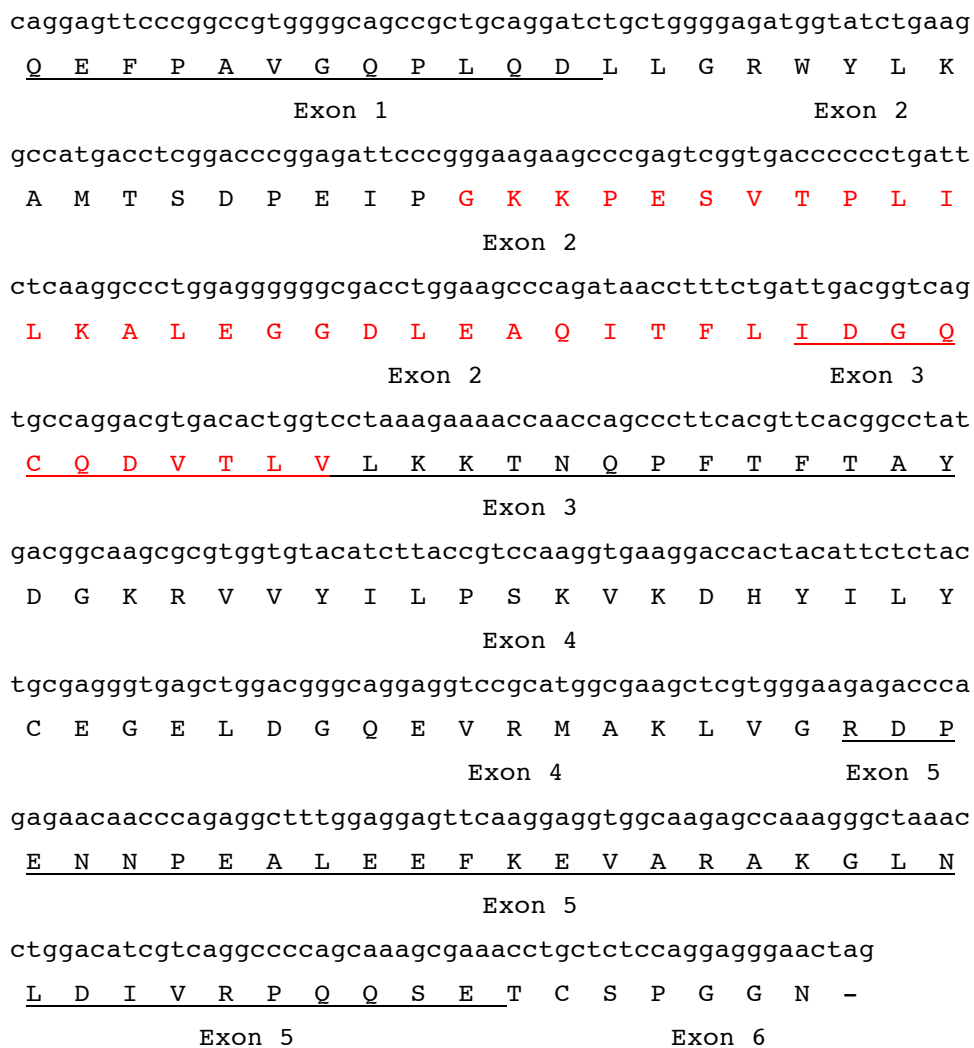


Figure 32 : Structure du gène codant la VEG montrant la position des acides aminés manquant dans les exons 2 et 3. Les exons 1, 3 et 5 sont soulignés, et la séquence absente des VEG tronquées (fractions 4 à 5) est indiquée en rouge.

L'existence d'isoformes de structure primaire est ici avérée pour la VEG de la MR d'animaux pré-pubères. Cependant, il a été montré au laboratoire qu'il existe dans la MR d'animaux adultes une OBP tronquée, alors que la forme tronquée de la VEG en est absente. Il

semble donc que la régulation de l'expression des gènes codant les OBP soit influencée par le stade physiologique de l'animal, régulé en l'occurrence par les niveaux de testostérone qui vont entraîner la puberté. De plus, signalons que le gène codant l'OGT se trouve sur le chromosome X chez le porc, comme l'OBP.

Nous avons recherché si les sites de phosphorylation et de *O*-GlcNac pouvaient être conservés entre l'OBP et la VEG, malgré le peu d'homologie entre les deux séquences. Les sites ont été reportés sur les séquences et il apparaît qu'ils ne sont pas conservés entre les deux protéines (Figure 33). Ce résultat n'est pas surprenant puisque les deux protéines et leurs gènes sont peu homologues, et ces gènes sont situés sur des chromosomes différents, certainement soumis à des régulations différentes.

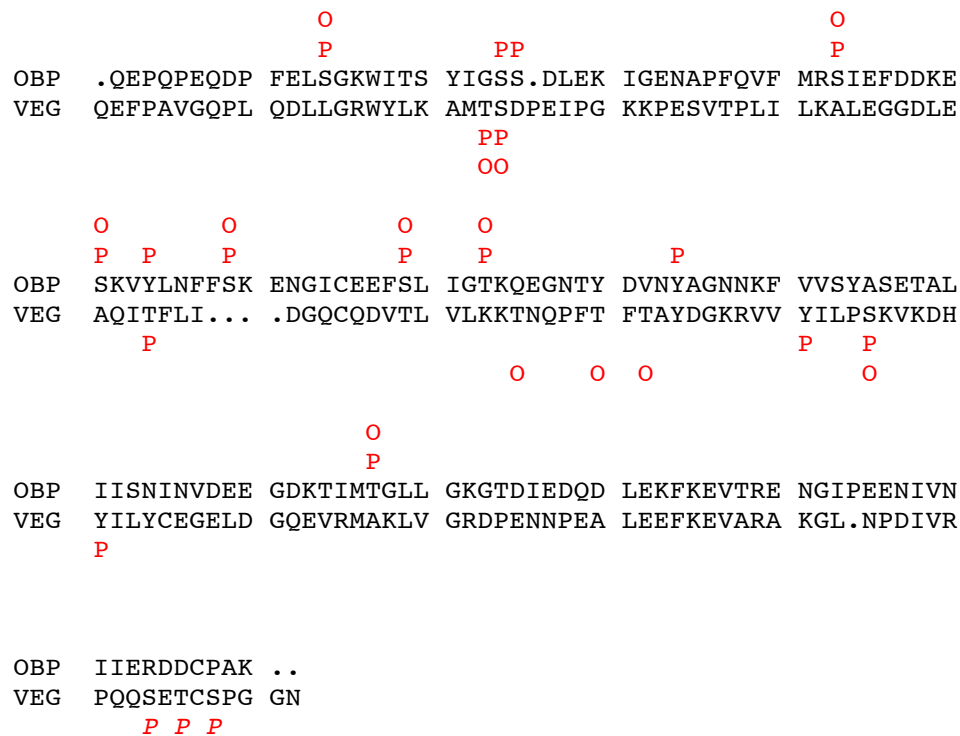


Figure 33 : Comparaison des sites de phosphorylation de l'OBP et de la VEG. Tous les sites sont reportés (natives, totale et isoformes). Les groupements en italiques sont des modifications potentielles.

IV. Les voies de biosynthèse de la modification des OBP

L'étude des voies de biosynthèse conduisant aux MPT des OBP n'a pu être abordée dans le cadre de ce travail, mais elle en constitue une des perspectives les plus attrayantes. En effet, la modification des OBPs par la phosphorylation et la *O*-GlcNac est un aspect très innovant non seulement dans le domaine de l'olfaction, mais aussi dans celui des modifications post-traductionnelles.

Nous avons mis en évidence des modifications post-traductionnelles de l'OBP et de la VEG qui ne sont pas censées modifier les protéines sécrétées. D'une part, la sécrétion de l'OBP et de la VEG est certaine, comme en témoigne la présence de peptide signal dans les ARNm, et la présence de ces protéines dans le compartiment extracellulaire, le mucus nasal. D'autre part, le marquage important avec des anticorps spécifiques de ces MPT (absent pour les VEG tronquées) et la localisation de sites potentiels confirment la présence de MPT. Enfin, même si les auteurs ne l'ont pas interprété en tant que telle, il existe des résidus de *O*-GlcNac sur des isoformes de la SAL (Loëbel *et al.*, 2000) et de l'aphrodisine (Briand *et al.*, 2000). Il est d'ailleurs tout à fait remarquable que si l'on interroge le serveur Yin-O-Yang (www.expasy.org) en enlevant le peptide signal de ces protéines (VEG, SAL, aphrodisine), des sites de Yin-O-Yang sont prédits. Par contre, aucun site de N-glycosylation n'est prédit pour l'OBP et la VEG avec leur peptide signal (NetNGlyc, www.expasy.org).

Phosphorylation et *O*-GlcNacylation affectent majoritairement les protéines nucléaires et cytoplasmiques. Cependant, des ectophosphatases et des ectokinases associées à la membrane du côté extracellulaire (Jordan *et al.*, 1994; Nath *et al.*, 2008) permettent d'envisager un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation des protéines sécrétées. Ainsi les protéines, après sécrétion, peuvent être internalisées et modifiées par des kinases cellulaires pour ensuite retraverser la membrane vers l'extérieur. Au contraire, elles peuvent être phosphorylées à l'extérieur et internalisées pour être déphosphorylées en intracellulaire. Les lipocalines subissent des internalisations (Elangovan *et al.*, 2004) qui dans le cas des OBP peuvent être un moyen de désensibilisation des récepteurs : une fois que l'OBP complexée à son ligand a interagit avec le récepteur, elle est internalisée pour être dégradée. Cette internalisation suivie de dégradation a été démontrée pour les OBP d'insectes, dont le turn-over intracellulaire/extracellulaire est très rapide (Steinbrecht, 1998).

En ce qui concerne la *O*-GlcNacylation, Holt & Hart (1996) ont mis en évidence la présence de protéines modifiées par la *O*-GlcNac dans de nombreux compartiments cellulaires et organelles : le noyau, la membrane nucléaire, les microsomes lisses et rugueux,

l'appareil de Golgi et le cytoplasme. Mais l'enzyme responsable de l'ajout de *O*-GlcNac, l'OGT, n'a pas été localisée dans le RER jusqu'à présent. Nous ne pouvons donc qu'émettre des hypothèses quant aux voies de trafic cellulaire empruntées par les OBP pour y subir ces deux MPT (Figure 34) :

- La première hypothèse est qu'il existerait une isoforme de l'OGT dans le réticulum endoplasmique ou dans l'appareil de Golgi. Dans ce cas, cette pseudo-OGT est-elle dérivée de l'OGT nucléocytoplasmique ou dérivée de la *O*-GlcNac transférase golgienne?

- Dans la deuxième hypothèse, il existerait une forme sécrétée de l'OGT qui modifierait les protéines dans le compartiment extracellulaire. Dans ce cas, il faudrait amplifier un ADN codant comprenant une séquence signal et mettre en évidence la présence d'UDP-GlcNac dans le mucus nasal.

- Une troisième possibilité serait que les protéines puissent naviguer d'un compartiment à l'autre. Des protéines chaperones pourraient déstructurer des protéines cytosoliques *O*-GlcNac qui pourraient ainsi traverser la membrane plasmique et être restructurées à l'extérieur. Cette hypothèse implique la présence de chaperones et d'ATP en dehors de la cellule, ce qui n'a pas encore été démontré. Pourtant la sécrétion de protéines nucléaires et cytosoliques, comme la nucléoline a été reportée (Legrand *et al.*, 2004).

- Enfin, une quatrième hypothèse serait que les OBP sont internalisées pour être glycosylées puis externalisées par des microsomes (cette voie n'est pas illustrée).

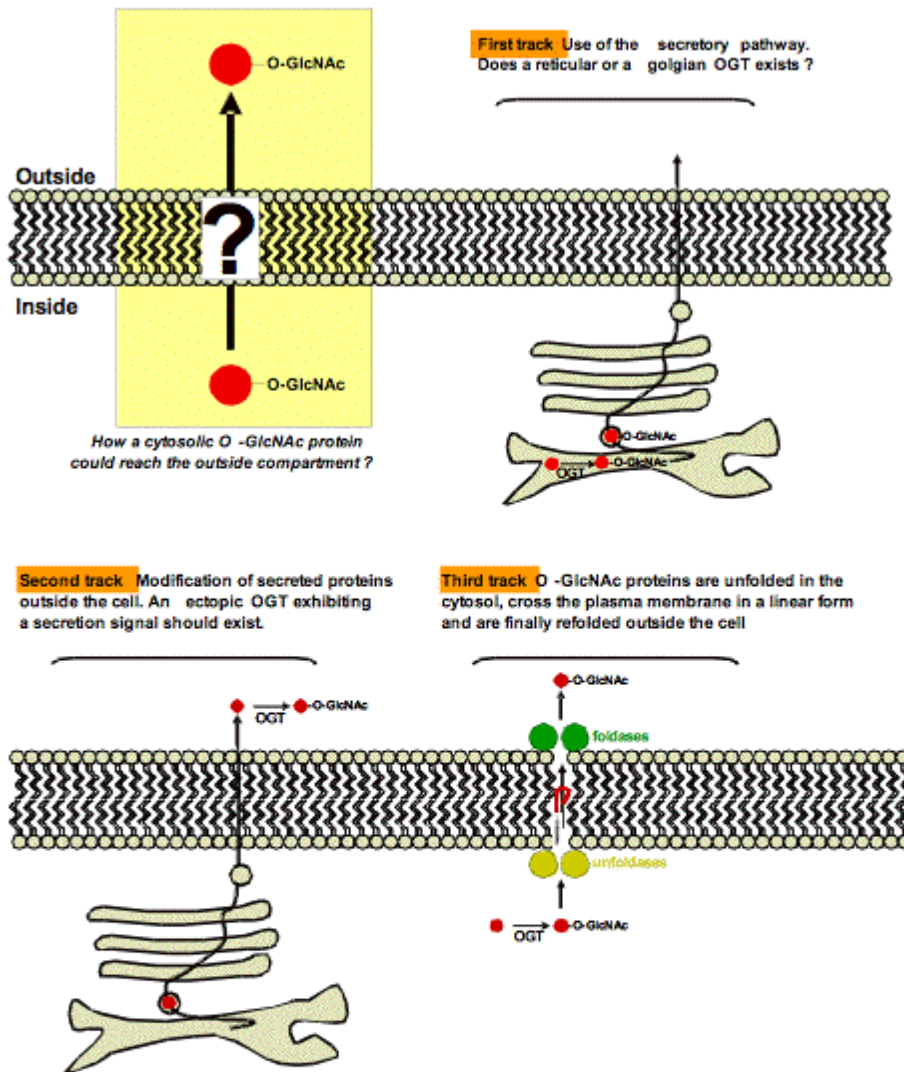


Figure 34 : Schéma des voies métaboliques hypothétiques pouvant expliquer la modification des OBP par la O-GlcNAc (Schéma Tony Lefebvre)

Conclusions et perspectives

Les OBP ont surtout été étudiées au niveau structural et fonctionnel (propriétés de liaison) de la protéine. Rien n'est connu de la régulation de l'expression de leurs gènes. Ces travaux ont mis en évidence que **les OBP sont soumises à des régulations post-transcriptionnelles et post-traductionnelles, qui génèrent un grand nombre d'isoformes sous l'influence de facteurs épigénétiques**. Ceci n'a jamais été démontré. Il faudra maintenant approfondir l'étude de la régulation de l'expression de ces gènes au niveau de l'épissage alternatif et déterminer de quels **facteurs externes ou internes** dépend cette régulation (stade physiologique, sexe, perception d'odeurs, interactions avec l'alimentation).

Ces différentes isoformes ont des affinités qui peuvent être très sélectives pour les ligands odorants. On a longtemps opposé la grande spécificité des récepteurs olfactifs au large spectre de liaison des OBP. Mais certains récepteurs olfactifs peuvent être stimulés par des molécules odorantes de structures chimiques voisines (Buck, 2004; Kato & Touhara, 2009), alors que des isoformes d'OBP sont capables de discriminer entre deux stéroïdes ne différant que par un alcool, liant l'un mais pas l'autre (androsténol, testostérone). Nos données montrent que **les OBP constituent la première étape du mécanisme de transduction des signaux olfactifs**. La première étape de la discrimination d'odeurs est assurée par de nombreuses isoformes d'OBP générées par des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Il reste, maintenant que des complexes spécifiques OBP/ligand ont été identifiés, à étudier l'interaction de ces complexes avec des récepteurs olfactifs. Des réponses seront peut-être apportées quant à la **nature du ligand du récepteur olfactif**.

Des protéines sécrétées peuvent porter des modifications post-traductionnelles, phosphorylation et O-GlcNac, classiquement décrites pour les protéines nucléaires et cytoplasmiques. L'étape suivante est d'élucider quelles **voies métaboliques** sont empruntées par les OBP pour subir ces modifications. La SAL n'a pas été étudiée dans ce travail, en raison de la complexité de ces isoformes, au sein d'un individu, et aussi en fonction du stade physiologique (Guiraudie, 2003). Pourtant, la présence simultanée de N-glycosylations, de phosphorylations et de O-GlcNac permettrait peut-être de mieux comprendre les relations entre MPT et spécificités de liaison, la SAL ne se liant qu'avec les stéroïdes sexuels. De même, il faudrait rechercher d'éventuelles MPT sur les protéines analogues des OBP, mais localisées dans les fluides physiologiques, dont le rôle est le transport de molécules odorantes

ou phéromonales. En d'autres termes, **les MPT sont-elles spécifiques des OBP de l'aire nasale, donc uniquement associées au mécanisme de transduction olfactive?**

Bibliographie

- Albert T., Urlbauer B., Kohlhuber F., Hammersen B. & Eick D. (1994) Ongoing mutations in the N-terminal domain of the c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene*, **9**, 759-763.
- Alonso A., Sasin J., Bottini N., Friedberg I., Friedberg I., Osterman A., Godzik A., Hunter T., Dixon J. & Mustelin T. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*, **117**, 699-711.
- Arino J. (2002) Novel protein phosphatases in yeast. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1072-1077.
- Arnold C. S., Johnson G. V., Cole R. N., Dong D. L., Lee M. & Hart G. W. (1996) The microtubule-associated protein tau is extensively modified with *O*-linked-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28741-28744.
- Bacchini A., Gaetani E. & Cavaggioni A. (1992) Pheromone binding proteins of the mouse, *Mus musculus*. *Experientia*, **48**, 420-421.
- Barford D. (1995) Protein phosphatases. *Cur. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 728-734.
- Bignetti E., Cavaggioni A., Pelosi P. Persaud K. C., Sorbi R. T. & Tirindelli R. (1985) Purification and characterisation of an odorant-binding protein from cow nasal tissue. *Eur. J. Biochem.*, **149**, 227-231.
- Bode A. M. & Dong Z. (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 793-805.
- Bollen M. & Stalmans W. (1992) The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **27**, 227-281.
- Breustedt D. A., Schönfeld D. L. & Skerra A. (2006) Comparative ligand-binding analysis of ten human lipocalins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 161-173.
- Briand L., Nespoulous C., Perez V., Rémy J. J., Huet J. C. & Pernollet J. C. (2000) Ligand-binding properties and structural characterization of a novel rat odorant-binding protein variant. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 3079-3089.
- Brimau F., Cornard J. P., Le Danvic C., Lagant P., Vergoten G., Grebert D., Pajot E. & Nagnan-Le Meillour P. (2010) Binding specificity of recombinant odorant-binding protein isoforms is driven by phosphorylation. *J. Chem. Ecol.*, **36**, 801-813.
- Buck, L. B. (2000) The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell*, **100**, 611-618.

- Buck, L. B. (2004) Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutr. Rev.*, 62:S184-188& S224-241.
- Buck L. B. & Axel R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**, 175-187.
- Burova T. V., Choiset Y., Jankowski C. K. & Haertlé T. (1999) Conformational stability and binding properties of porcine odorant binding protein. *Biochemistry*, **38**, 15043-15051.
- Burova T. V., Rabesona H., Choiset Y., Jankowski C. K., Sawyer L. & Haertlé T. (2000) Why has porcine VEG protein unusually high stability and suppressed binding ability? *Biochem. Biophys. Acta*, **1478**, 267-279.
- Cassier P., Bohatier J., Descoins C. & Nagnan-Le Meillour P. (2000) Communication chimique et environnement, 256 p., Belin éditeur, Paris.
- Cavaggioni A. & Mucignat-Caretta C. (2000) Major Urinary proteins a2u-globulins and aphrodisin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1482**, 218-228.
- Cetinbas N., Macauley M. S., Stubbs K. A., Drapala R. & Vocadlo D. J. (2006) Identification of Asp 174 and Asp 175 as the key catalytic residues of human *O*-GlcNAcase by functional analysis of site-directed mutants. *Biochemistry*, **45**, 3835-3844.
- Ceulemans H. & Bollen M. (2004) Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev.*, **84**, 1-39.
- Cheek S., Ginalski K., Zhang H. and Grishin N. V. (2005) A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Struct. Biol.*, **5**, 1-19.
- Cheng X. & Hart G. W. (2001) Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta. Post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J. Biol. Chem.*, **276**, 10570-10575.
- Chou T. Y., Hart G. W. & Dang C. V. (1995) c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.*, **270**, 18961-18965.
- Cohen P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 453-508.
- Cohen P. T. (1997) Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 245-251.
- Cohen P. (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nat. Cell Biol.*, **4**, E127-130.
- Comer F. I. & 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.

- Comer F. I. & Hart G. W. (2001) Reciprocity between *O*-GlcNAc and *O*-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry*, **40**, 7845-7852.
- Comtesse N., Maldener E. & Meese E. (2001) Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 634-640.
- Corpet (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, **16**, 10881-10890.
- Cozzone, A. J. (1998) Post-translational modification of proteins by reversible phosphorylation in prokaryotes. *Biochimie*, **80**, 43-48.
- 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.*, **99B**, 445-451.
- Daly R. & Hearn M. T. W. (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.*, **18**, 119-138.
- Das A. K., Cohen P. T. & Barford D. (1998) The structure of the tetra-tricopeptide repeats of the protein phosphatase 5: implications for TRP-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.*, **17**, 1192-1199.
- Datta B., Ray M. K., Chakrabarti D., Wylie D. E. & Gupta N. K. (1989) Glycosylation of eukaryotic peptide chain initiator Factor 2 (eIF-2)-associated 67-kDa polypeptide (p67) and its possible role in the inhibition of eIF-2 kinase-catalyzed phosphorylation of the eIF-2 alpha-subunit. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20620-20624.
- Datta R., Choudhury P., Ghosh A. & Datta B. (2003) A glycosylation site, ⁶⁰SGTS₆₃, of p67 is required for its ability to regulate the phosphorylation and activity of eukaryotic initiation Factor 2 alpha. *Biochemistry*, **42**, 5453-5460.
- Davis L. I. & Blodel G. (1987) Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7552-7556.
- Denu J. M. & Dixon J. E. (1998) Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 633-641.
- De Paoli-Roach A. A., Park I. K., Cerovsky V., Csontos C., Durbin S. D., Kuntz M. J., Sitikov A., Tang P. M., Verin A. & Zolnierowicz S. (1994) Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv. Enzyme Regul.*, **34**, 199-224.

- Dickman M. B. & Yarden O. (1999) Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.*, **26**, 99-117.
- Ding X. X., Koop D. R., Croop B. L. & Coon M. J. (1986) Immunochemical identification of cytochrome P-450 isozyme 3a (P-450ALC) in rabbit nasal and kidney microsomes and evidence for differential induction by alcohol. *Mol. Pharmacol.*, **30**, 370-378.
- Dong D. L. & Hart G. W. (1994) Purification and characterization of an *O*-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J. Biol. Chem.*, **269**, 19321-19330.
- Dorries K. M., Adkins-Regan E. & Halpern B. (1995) Olfactory sensitivity to the pheromone, androstenone, is sexually dimorphic in the pig. *Physiol. Behav.*, **57**, 255-259.
- Døving K. B. & Trotier D. (1998) Structure and function of the vomeronasal organ. *J. Exp. Biol.*, **201**, 2913-2925.
- Dulac C. (1997) Biologie moléculaire et perception des phéromones chez les mammifères. *m/s*, **13**, 201-207.
- Dulac C. & Axel R. (1995) A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, **83**, 195-206.
- Elangovan N., Lee Y. C., Tzeng W. F. & Chua S. T. (2004) Delivery of ferric ion to mouse spermatozoa is mediated by lipocalin internalization. *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **319**, 1096-1104.
- Fang B. & Miller M. W. (2001) Use of galactosyltransferase to assess the biological function of *O*-linked N-acetyl-d-glucosamine: a potential role for *O*-GlcNAc during cell division. *Exp. Cell. Res.*, **263**, 243-253.
- Felicioli A., Ganni M., Garibotti M. & Pelosi P. (1993) Multiple types and forms of odorant-binding proteins in the old world porcupine *Hystrix cristata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **105B**, 755-784.
- Finlayson J. S., Hudson D. M. & Armstrong B. L. (1969) Location of the MUP-a locus on mouse linkage group 8. *Genet. Res.*, **14**, 329-331.
- Flower D. R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.*, **318**, 1-14.
- Fukunaga K., Kobayashi T., Tamura S. & Miyamoto E. (1993) Dephosphorylation of autophosphorylated Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 2 C. *J. Biol. Chem.*, **268**, 133-137.

- Gao Y., Wells L., Comer F. I., Parker G. J. & Hart G. W. (2001) Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9838-9845.
- Garibotti M., Christiansen H., Schmale H. & Pelosi P. (1995) Porcine VEG proteins and tear prealbumins. *Chem. Senses*, **20**, 69-76.
- Gellissen G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 741-750.
- Getchell T. V., Margolis F. L. & Getchell M. L. (1984) Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Prog. Neurobiol.*, **23**, 317-345.
- Getchell M. L. & Getchell T. V. (1991) Immunohistochemical localization of components of the immune barrier in the olfactory mucosae of salamanders and rats. *Anat. Rec.*, **231**, 358-374.
- Glasgow B. J., Abduragimov A. R., Farahbakhsh Z. T., Faull K. F. & Hubell W. L. (1995) Tear lipocalins bind a broad array of lipid ligands. *Curr. Eye Res.*, **14**, 363-372.
- Golebiowski J., Antonczak S. & Cabrol-Bass D. (2006) Molecular dynamics studies of odorant binding protein free of ligand and complexed to pyrazine and octenol. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **763**, 165-174.
- Golebiowski J., Antonczak S., Fiorucci S. & Cabrol-Bass D. (2007) Mechanistic events underlying odorant binding chemoreception. *Proteins*, **67**, 448-458.
- Greis K. D., Gibson W. & Hart G. W. (1994) Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (URL32) at serine 921 and serine 952. *J. Virol.*, **68**, 8339-8349.
- Grzyb J., Latowski D. & Strzalka K. (2006) Lipocalins - a family portrait. *J. Plant Physiol.*, **163**, 895-915.
- Gu J., Dudley C., Su T., Spink D. C., Zhang Q. Y., Moss R. L. & Ding X. (1999) Cytochrome P450 and steroid hydroxylase activity in mouse olfactory and vomeronasal mucosa. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **266**, 262-267.
- Guiraudie G., Pageat P., Cain A. H., 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**, 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., Clot-Faybesse O., Pageat P., Malosse C., Cain A. H., Ronin C. & Nagnan-Le Meillour P. (2005a) Heterologous expression of piglet odorant-binding protein in *Pichia pastoris*: a comparative structural and functional characterization with native forms. *J. Biotechnol.*, **117**, 11-19.
- Guiraudie-Capraz G., Slomianny M. C., Pageat P., Malosse C., Cain A. H., Orgeur P., Nagnan-Le Meillour P. (2005b) Biochemical and chemical supports for a transnatal olfactory continuity through sow maternal fluids. *Chem. Senses*, **30**, 241-251.
- Hajjar E., Perahia D., Débat H., Nespoulous C. & Robert C. H. (2006) Odorant binding and conformational dynamics in the odorant-binding protein. *J. Biol. Chem.*, **281**, 29929-29937.
- Haltiwanger R. S., Holt G. D. & Hart G. W. (1990) Enzymatic addition of *O*-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of uridine diphospho-N-acetylglucosamine peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **265**, 2563-2568.
- Haltiwanger R. S., Blomberg M. A. & Hart G. W. (1992) Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of uridine diphospho-N-acetylglucosamine polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 9005-9013.
- Hanks S. K., Quinn A. M. and Hunter T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.
- Hanover J. A., Cohen C. K., Willingham M. C. & Park M. K. (1987) *O*-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J. Biol. Chem.*, **262**, 9887-9894.
- Hanover J. A., Forsythe M. E., Hennessey P. T., Brodigan T. M., Love D. C., Ashwell G. & Krause M. (2005) A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macromutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 11266-11271.
- Heckel D., Comtesse N., Brass N., Blin N., Zang K. D. & Meese E. (1998) Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 1859-1872.
- Hendrix P., Mayer-Jaekel R. F., Cron P., Goris J., Hotsteenge J., Merlevede W. & Hemmings B. A. (1993) Structure and Expression of a 72-kDa Regulatory Subunit of Protein

- Phosphatase 2A. Evidence for different size forms produced by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15267-15276.
- Herrada G. & Dulac C. (1997) A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*, **90**, 763-773.
- Hirschberg C. B. & Snider M. D. (1987) Topography of glycosylation in the rough endoplasmic réticulum and Golgi apparatus. *Annu. Rev. Biochem.*, **56**, 63-87.
- Holt G. D. & Hart G. W. (1986) The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.*, **261**, 8049-8057.
- Holt G. D. & Hart G. W. (1996) The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. *J. Biol. Chem.*, **17**, 8049-8057.
- Holt G. D., Snow C. M., Senior A., Haltiwanger R. S., Gerace L. & Hart G. W. (1987) Nuclear pore complex glycoprotein contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J. Cell Biol.*, **104**, 1157-1164.
- Holy T. E., Dulac C. & Meister M. (2000) Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science*, **289**, 1569-1572.
- Hu Y., Suarez J., Fricovsky E., Wang H., Scott B. T., Trauger S. A., Han W., Hu Y., Oyeleye M. O. & Dillmann W. H. (2009) Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J. Biol. Chem.*, **284**, 547-555.
- Hubard M. J. & Cohen P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 172-177.
- Hunter, T. (1991) Protein kinase classification. *Methods Enzymol.*, **200**, 3-37.
- Hunter, T. (2000) Signaling-2000 and beyond. *Cell*, **100**, 113-127.
- Hurst J. L., Payne C. E., Nevison C. M., Marie A. D., Humphries R. E., Robertson D. H., Cavaggioni A. & Beynon R. J. (2001) Individual recognition in mice mediated by major urinary proteins. *Nature*, **414**, 631-634.
- Jain J., McCaffrey P. G., Miner Z., Kerppola T. K., Lambert J. N., Verdine G. L., Curran T. & Rao A. (1993) The T-cell transcription factor NFAT_p is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*, **365**, 352-355.

- Jordan P., Heid H., Kinzel V. & Kubler D. (1994) Major cell surface-located protein substrates of an ecto-protein kinase are homologs of known nuclear proteins. *Biochemistry*, **33**, 14696-14706.
- 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**, 6018-6025.
- Kamemura K. & Hart G. W. (2003) Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **73**, 107-136.
- Kato G. J. & Dang C. V. (1992) Function of the c-Myc oncoprotein. *FASEB. J.*, **6**, 3065-3072.
- Kato A. & Touhara K. (2009) Mammalian olfactory receptors: pharmacology, G protein coupling and desensitization. *Cell Mol. Life Sci.*, **66**, 3743-3753.
- Karlson P. & Lüscher M. (1959) « Pheromones »: a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature*, **183**, 55-56.
- Kearse K. P. & Hart G. W. (1991a) Topology of O-linked N-acetylglucosamine in murine lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **290**, 543-548.
- Kearse K. P. & Hart G. W. (1991b) Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **88**, 1701-1705.
- Kelly W. G. & Hart G. W. (1989) Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in Drosophila chromatin. *Cell*, **57**, 243-251.
- Kelly W. G., Dahmus M. E. & Hart G. W. (1993) RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J. Biol. Chem.*, **268**, 10416-10424.
- Keverne E. B. (1999) The vomeronasal organ. *Science*, **286**, 716-720.
- Kim E. J., Kang D. O., Love D. C. & Hanover J. A. (2006) Enzymatic characterization of O-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate. *Carbohydr. Res.* **341**, 971-982.
- Ko H. J., Lee S. H., Oh E. H. & Park T. H. (2010) Specificity of odorant-binding proteins: a factor influencing the sensitivity of olfactory receptor-based biosensors. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, **33**, 55-62.

- Kostich M., English J., Madison V., Gheyas F., Wang L., Qiu P., Greene J. & Laz, T. M. (2002) Human members of the eukaryotic protein kinase family. *Genome Biol.*, **3**, research0043.1-research0043.12.
- Krebs E. G. and Fischer E. H. (1955) Phosphorylase activity of skeletal muscle extracts. *J. Biol. Chem.*, **216**, 113-120.
- Kreppel L. K., Blomberg M. A. & Hart G. W. (1997) Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique *O*-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9308-9315.
- Kreppel L. K. & Hart G. W. (1999) Regulation of a cytosolic and nuclear *O*-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.*, **274**, 32015-32022.
- Kopecky Jr V., Ettrich R., Hofbauerova K. & Baumruk V. (2003) Structure of human alpha1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **300**, 41-46.
- Krieger J., Schmitt A., Löbel D., Gudermann, Scultz 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**, 4655-4662.
- Lamb J. R., Tugendreich S. & Hieter P. (1995) Tetratricopeptide repeat interactions: to TOR or not TOR ? *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 257-259.
- Lander E. S. & al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
- Lazar J., Greenwood D. R., Rasmussen L. E. & Prestwich G. D. (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**, 1786-1794.
- Lazarus B. D., Love D. C. & Hanover J. A. (2006) Recombinant *O*-GlcNAc transferase isoforms: identification of *O*-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology*, **16**, 415-421.
- Le Danvic C. (2009) Détection de l'oestrus chez les bovins. Thèse de doctorat, Université de Lille 1, France.
- Le Danvic C., Guiraudie-Capraz G., Abderrahmani D., Zanetta J. P. & Nagnan-Le Meillour P. (2009) Natural Ligands of Porcine Olfactory Binding Proteins. *J. Chem. Ecol.*, **35**, 741-751.

- Lefebvre T., Ferreira S., Dupont-Wallois L., Bussière T., Dupire M. J., Delacourte A., Michalski J. C. & Caillet-Boudin M. L. (2003) Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins—a role in nuclear localization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1619**, 167-176.
- Legrand D., Vigié K., Said E. A., Ellass E., Masson M., Slomianny M. C., Carpentier M., Briand J. P., Mazurier J. & Hovanessian A. G. (2004) Surface nucleoline participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 303-317.
- Leinders-Zufall T., Lane A.P., Puche A.C., Ma W., Novotny M. V., Shipley M. T. & Zufall F. (2000) Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature*, **405**, 792-796.
- Letourneur O., Gervasi G., Gaia S., Pages J., Watelet B. & Jolivet M. (2001) Characterisation of *Toxoplasma gondii* surface antigen I (SAGI) secreted from *Pichia pastoris* : evidence of hyper O-glycosylation. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **33**, 35-45.
- Loëbel D., Marchese S., Krieger J., Pelosi P. & Breer H. (1998) Sub-types of odorant-binding proteins - Heterologous expression and ligand binding. *Eur. J. Biochem.*, **254**, 318-324.
- Loëbel 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**, 369-379.
- Loëbel D., Jacob M., Völkner M. & Breer H. (2002) Odorants of different chemical classes interact with distinct odorant binding protein subtypes. *Chem. Senses*, **27**, 39-44.
- Love D. C., Kocham J., Cathey R. L., Shin S. H. & Hanover J. A. (2003) Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J. Cell Sci.*, **116**, 647-654.
- Lubas W. A., Franck D. W., Krause M. & Hanover J. A. (1997) O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9316-9324.
- Madec I., Guiraudie G. & Pageat P. (2002) The pig appeasing pheromone (PAP): effects on behavior and performances. *Proc. 17th IPVS Congress*, Iowa.
- Mc Glone J. J. (1985) Olfactory cues and pig agonistic behavior: evidence for a submissive pheromone. *Physiol. Behav.*, **34**, 195-198.
- Mc Glone J. J., Stansbury W. F. & Tribble L. F. (1986) Aerosolized 5 α -androst-16-en-3-one reduced agonistic behavior and temporarily improved performance of growing pigs. *J. Anim. Sci.*, **63**, 679-684.

- Mc Glone, J. J. & Morrow, J. L. (1988) Reduction of pig agonistic behavior by androstenone. *J. Anim. Sci.*, **66**, 880-884.
- Mc Glone J. J. & Anderson D. L. (2002) Synthetic maternal pheromone stimulates feeding behavior and weight gain in weaned pigs. *J. Anim. Sci.*, **80**, 3179-3183.
- Mann M., Ong S.-E., Gronborg M., Steen H., Jensen O. N. & Pandey A. (2002) Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol.*, **20**, 261-268.
- Mans B. J. & Neitz A. W. H. (2004) Exon-intron structure of outlier tick lipocalins indicate a monophyletic origin within the larger lipocalin family. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **34**, 585-594.
- Marchese S., Pes D., Scaloni A., Carbone V. & Pelosi P. (1998) Lipocalins of boar salivary glands binding odours and pheromones. *Eur. J. Biochem.*, **252**, 563-568.
- Marshall S., Bacote V. & Traxinger R. R. (1991) Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4706-4712.
- Martinez-Fleitz C., Macauley M. S., He Y., Shen D. L., Vocadlo, D. J. & Davies G. J. (2008) Structure of an *O*-GlcNAc transferase homolog provides insight into intracellular glycosylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 764-765.
- Matsunami H. & Buck L. B. (1997) A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, **90**, 775-787.
- Matsuoka M., Yoshida- Matsuoka J., Iwasaki N., Norita M., Costanzo R. M. & Ichikawa M. (2001) Immunocytochemical study of Gi2 α and G0 α on the epithelium surface of the rat vomeronasal organ. *Chem Senses*, **26**, 161-166.
- Mattarazzo V., Zsüger N., Guillemot J. C., Clot-Faybesse O., Botto J. M., Dal Farra C., Crowe M., Demaille J., Vincent J. P., Mazella J. & Ronin C. (2002) Porcine Odorant-binding protein selectively binds to a human olfactory receptor. *Chem. Senses*, **27**, 691-701.
- Matthews H. R. (1995) Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol. Ther.*, **67**, 323-350.
- Medina L., Grove K. & Haltiwanger R. S. (1998) SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology*, **8**, 383-391.

- Melrose D. R., Reed H. C. B. & Patterson R. L. S. (1971) Androgen steroids associated with boar odour as an aid to the detection of oestrus in pig artificial insemination. *Br. Vet. J.*, **127**, 497-502.
- Mombaerts P. (1999) Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.*, **22**, 487-509.
- Nagnan-Le Meillour P., Lagant P., Cornard J. P., Brimau F., Le Danvic C., Vergoten G. & Michalski J. C. (2009a) 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.
- Nagnan-Le Meillour P., Le Danvic C., Brimau F., Chemineau P. & Michalski J. C. (2009b) Phosphorylation of native porcine olfactory binding proteins. *J. Chem. Ecol.*, **35**, 752-760.
- Nath D., Maiti A. & Majumder G. C. (2008) Cell surface phosphorylation by a novel ecto-protein kinase: A key regulator of cellular functions in spermatozoa. *Biochim. Biophysica. Acta*, **1778**, 153-165.
- Nef P., Heldman J., Lazard D., Margalit T., Jay M., Hanukoglu I. & Lancet D. (1989) Olfactory-specific cytochrome P-450: cDNA cloning of a novel neuroepithelial enzyme possibly involved in chemoreception. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6780-6785.
- Nishi K., Maruyama T., Halsall H. B., Handa T. & Otagiri M. (2004) Binding of alpha1-acid glycoprotein to membrane results in a unique structural change and ligand release. *Biochemistry*, **43**, 10513-10519.
- Nolte D. & Müller U. (2002) Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm. Genome*, **13**, 62-64.
- Novotny M. V., 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**, 2017-2022.
- Pageat P. & Tessier Y. (1998) Can a pig pheromone analogue improve daily weight gain and food conversion efficiency post-weaning? *Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham*.
- Pageat P., inventor (2001) Pig appeasing pheromones to decrease stress, anxiety and aggressiveness. US Pat. N° 6, 169, 113.
- Paolini S., Scaloni A., Amoresano A., Marchese S. & Pelosi P. (1998) Amino-acid sequence, post-translational modifications, binding and labelling of porcine odorant-binding protein. *Chem. Senses*, **23**, 689-698.

- Paolini S., Tanfani F., Fini C., Bertoli E. & Pelosi P. (1999) Porcine odorant-binding protein: structural stability and ligand affinities measured by Fourier-transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1431**, 179-188.
- Parisi M., Mazzini A., Sorbi R. T., Ramoni R., Grolli S. & Favilla R. (2003) Unfolding and refolding of porcine odorant binding protein in guanidium hydrochloride: equilibrium studies at neutral pH. *Biochim. Biophys. Acta*, **1652**, 115-125.
- Pelosi P. (1994) Odorant-binding proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 199-228.
- Pelosi P., Baldaccini N. E. & Pisanelli A. M. (1982) Identification of a specific olfactory receptor for 2-isobutyl-3-methoxypyrazine. *Biochem. J.*, **201**, 245-248.
- Pelosi P. & Tirindelli R. (1989) Structure-activity studies and characterization of an odorant-binding protein. In: Chemical Senses: Receptor events and transduction in taste and olfaction, vol. 1, pp207-226. Brand J. G., Teeter J. H., Cagan R. H., and Kare M. R. (eds), Dekker, New York.
- Perduca M., Mancina F., Del Giorgio R. & Monaco H. L. (2001) Crystal structure of a truncated form of porcine odorant-binding protein. *Proteins*, **42**, 201-209.
- Perez M. D., Sanchez L., Aranda P., Ena J. M., Oria R. & Calvo M. (1992) Effect of beta-lactoglobulin on the activity of pregastric lipase. A possible role for this protein in ruminant milk. *Biochim. Biophys. Acta*, **1123**, 151-155.
- Pevsner J., Sklar P. B. & Snyder S. H. (1986) Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **83**, 4942-4946.
- Pevsner J., Hwang P. M., Sklar P. B., Clark Venable J. & Snyder S. H. (1988) Odorant-binding protein and its mRNA are localized to lateral nasal gland implying a carrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2383-2387.
- Pevsner J, Hou V, Snowman AM, Snyder SH (1990) Odorant-binding protein - Characterization of ligand binding. *J. Biol. Chem.*, **265**, 6118-6125.
- Pulverer B. J., Fisher C., Vousden K., Littlewood T., Evan G. & Woodgett J. R. (1994) Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo. *Oncogene*, **9**, 59-70.
- Ragona L., Pusteria F., Zetta L., Monaco H. L. & Molinari H. (1997) Identification of a conserved hydrophobic cluster in partially folded bovine b-lactoglobulin at pH 2. *Fold Des*, **2**, 281-290.

- Ramoni R., Vincent F., Grolli S., Conti V., Malosse C., Boyer F.-D., Nagnan-Le Meillour P., Spinelli S., Cambillau C. & 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.
- Rasmussen L. E., Schmidt M. J., Henneous R., Groves D. & Daves G. D. Jr (1982) Asian bull elephants: Flehmen-like responses to extractable components in female elephant oestrous urine. *Science*, **217**, 159-162.
- Rasmussen L. E., Lee T. D., Zhang A., Roelofs W. L. & Daves G. D. 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**, 417-437.
- Rasmussen L. E. (2001) Source and cyclic release pattern of (Z)-7-dodecenyl acetate, the pre-ovulatory pheromone of the female Asian elephant. *Chem. Senses*, **26**, 611-623.
- Redl B. (2000) Human tear lipocalin. *Biochim. Biophys. Acta*, **482**, 241-248.
- Reed H. C. B., Melrose D. R. & Patterson L. S. (1974) Androgen steroids as an aid to the detection of œstrus in pig artificial insemination. *Br. Vet. J.*, **130**, 61-67.
- Rechsteiner M. & Rogers S. W. (1996) PEST sequences and régulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 267-271.
- Roberts S. A., Simpson D. M., Armstrong S. D., Davidson A. J., Robertson D. H., Mc Lean L., Beynon R. J. & Hurst J. L. (2010) Darcin: a male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biol.*, **3**, 8-75.
- Robertson D. H., Cox K. A., Gaskell S. J., Evershed R. P. & Beynon R. J. (1996) Molecular heterogeneity in the Major Urinary Proteins of the house mouse *Mus musculus*. *Biochem. J.*, **316**, 265-272.
- Roos M. D. & Hanover J. A. (2000) Structure of O-linked GlcNAc transferase: mediator of glycan-dependent signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 275-280.
- Ryba N. P. J. & Tirindelli R. (1997) A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neurons*, **19**, 371-379.
- Sanchez D., Ganfornina M. D., Gutierrez G. & Marin A. (2003) Exon-intron structure and evolution of the lipocalin gene family. *Mol. Biol. Evol.*, **20**, 775-783.
- Saraste M. (1999) Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle, *Science*, **283**, 1488-1493.

- 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-binding proteins from pig nasal epithelium. *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 823-834.
- Schaal B., Coureaud G., Langlois D., Giniès C., Sémon E. & Perrier G. (2003) Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*, **424**, 68-72.
- Schelikoff M., Sinskey A. J. & Stephanopoulos G. (1996) A modeling framework for the study of protein glycosylation. *Biotechnol. Bioengng*, **50**, 73-90.
- Schenk, P. W. and Snaar-Jagalska, B. E. (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Bba Mol. Cell Res.*, **1449**, 1-24.
- Schirm M., Kalmokoff M., Aubry A., Thibault P., Sandoz M. & Logan S. M. (2004) Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine. *J. Bacteriol.*, **186**, 6721-6727.
- Shafi R., Iyer S. P., Ellies L. G., O'Donnell N., Marek K. W., Chui D., Hart G. W. & Marth J. D. (2000) The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5735-5739.
- Shaw P. H., Held W. A. & Hastle N. D. (1983) The gene family for major urinary proteins: expression in several secretory tissues of the mouse. *Cell*, **32**, 755-761.
- Shaw P., Freeman J., Bovey R. & Iggo R. (1996) Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residus at the carboxy-terminus. *Oncogene*, **12**, 921-930.
- Shenolikar S. & Nairn A. C. (1990) Protein phosphatases: Recent progress. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **23**,1-121.
- Signoret J. P. (1970) Reproductive behaviour of pigs. *J. Reprod. Fert.*, Suppl. **11**, 105-117.
- Singer A. G. & Macrides F. (1990) Aphrodisin: pheromone or transducer? *Chem. Senses*, **15**, 199-203.
- Singer A. G., Macrides F., Clancy A. N. & Agosta W. C. (1986) Purification and analysis of a proteinaceous aphrodisiac pheromone from hamster vaginal discharge. *J. Biol. Chem.*, **261**, 13323-13326.
- Singer A. G., Agosta W. C., Clancy A. N. & Macrides F. (1987) The chemistry of vomeronasally detected pheromones: characterization of an aphrodisiac protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **519**, 287-298.

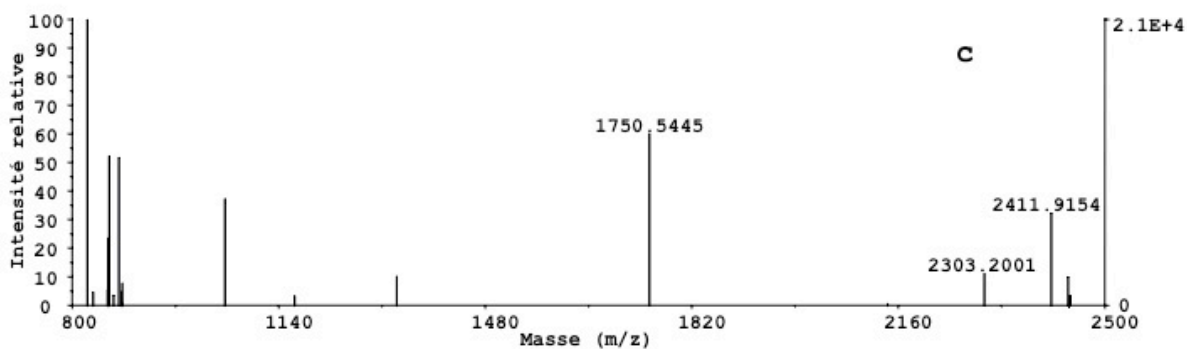
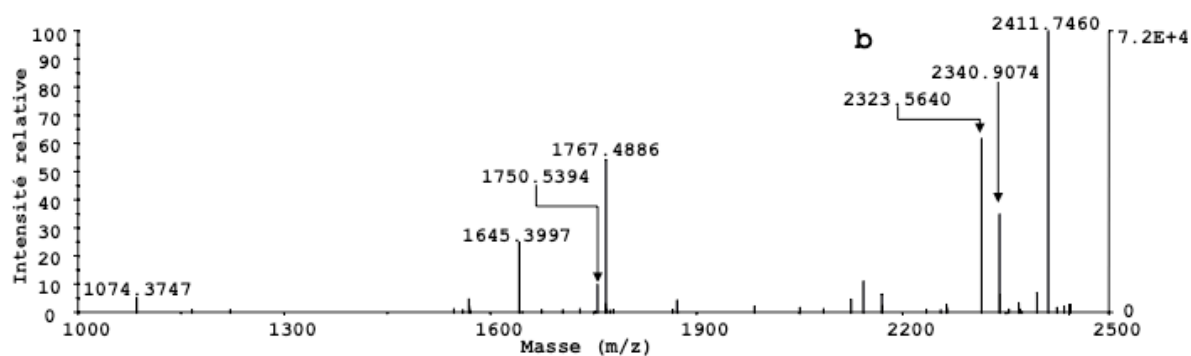
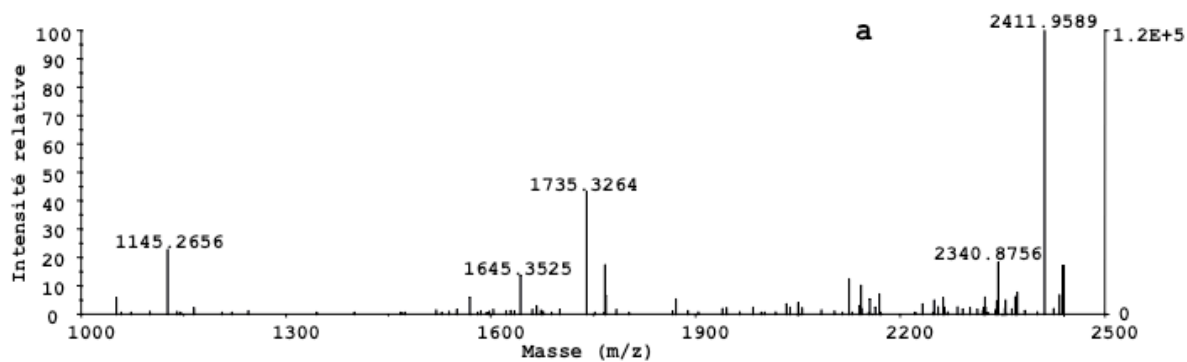
- Slawson C., Shafii S., Amburgey J. & Potter R (2002) Characterization of the O-GlcNAc protein modification in *Xenopus laevis* oocyte during oogenesis and progesterone-stimulated maturation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1573**, 121-129.
- Song M., Kim H. S., Park J. M., Kim I. H., Kim I. H., Ryu S. H. & Suh P. G. (2008) O-GlcNAc transferase is activated by CaMKIV-dependent phosphorylation under potassium chloride-induced depolarization in NG-108-15 cells. *Cell Signal*, **20**, 94-104.
- Spinelli S., Ramoni R., Grolli S., Bonicel J., Cambillau C. & Tegoni M. (1998) The structure of the monomeric porcine odorant binding protein sheds light on the domain swapping mechanism. *Biochemistry*, **37**, 7913-7918.
- Spinelli S., Vincent F., Pelosi P., Tegoni M. & Cambillau C. (2002) Boar salivary lipocalin. Three-dimensional X-ray structure and androstenol/androstenone docking simulations. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2449-2456.
- Staiano M., D'Auria S., Varriale A., Rossi M., Marabotti A., Fini C., Stepanenko O. V., Kuznetsova I. M. & Turoverov K. (2007a) Stability and dynamics of the porcine odorant-binding protein. *Biochemistry*, **46**, 11120-11127.
- Staiano M., Saviano M, Herman P., Grycznyski Z., Fini C., Varriale A., Parracino A., Bisgaard Kold A., Rossi M. & D'Auria S. (2007b) 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**, 284-291.
- Stark M. J. (1996) Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast*, **12**, 1647-1675.
- Steinbrecht R. A. (1998) Odorant-binding proteins: expression and function. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **30**, 323-332.
- Steinmetz E. J. (1997) Pre-mRNA processing and the CTD of RNA polymérase II: the tail that wags the dog ? *Cell*, **89**, 491-494.
- Stemmer P. & Klee C. B. (1991) Serine/threonine phosphatases in the nervous system. *Cur. Opin. Neurobiol.*, **1**, 53-64.
- Stepanenko O. V., Marabotti A., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Fini C., Varriale A., Staiano M., Rossi M. & D'Auria S. (2008) Hydrophobic interactions and ionic networks play an important role in thermal stability and denaturation mechanism of the porcine odorant-binding protein. *Proteins*, **71**, 35-44.

- Stopkova R., Zdrahal Z., Ryba S., Sedo O., Sandera M. & Stopka P. (2010) Novel OBP genes similar to hamster aphrodisin in the bank vole, *Myodes glareolus*. *BMC Genomics*, **11**, 45-55.
- Swain S. M., Tseng T. S. & Olszewski N. E. (2001) Altered expression of SPINDLY affects gibberelin response and plants development. *Plant. Physiol.*, **126**, 1174-1185.
- Tcatchoff L. (2006) Etude des interactions entre une protéine humaine de liaison aux odorants et ses partenaires, odorants et récepteurs olfactifs. Thèse de doctorat, Université de Versailles-Saint-Quentin, 153 p.
- Tcatchoff L., Nespoulous C., Pernollet J. C. & Briand L. (2006) A single lysil residue defines the binding specificity of human odorant-binding protein for aldehydes. *FEBS Lett.*, **580**, 2102-2108.
- 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. *Nature Struct. Biol.*, **3**, 863-867.
- 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**, 229-240.
- Thomas E. A., Laws S. M., Sutcliffe J. G., Harper C., Dean B., McLean C. et al. (2003) Apolipoprotein D levels are elevated in prefrontal cortex of subjects with Alzheimer's disease: no relation to apolipoprotein E expression or genotype. *Biol. Psychiatry*, **54**, 136-141.
- Tirindelli R., Mucignat-Caretta C. & Ryba N. P. J. (1998) Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends neurosci.*, **21**, 482-486.
- Toleman C., Paterson A. J., Whisenhunt T. R. & Kudlow J. E. (2004) Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J. Biol. Chem.*, **279**, 53665-53673.
- Toleman C., Paterson A. J. & Kudlow J. E. (2006) Location and characterization of the O-GlcNAcase active site. *Biochim. Biophys. Acta*, **1760**, 829-839.
- Torres C. R. & Hart G. W. (1984) Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces to intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.*, **259**, 3308-3317.
- Vicart A., Lefebvre T., Imbert J., Fernandez A. & Kahn-Perlès B. (2006) Increased chromatin association of Sp1 in interphase cells by PPA2-mediated dephosphorylations. *J. Mol. Biol.*, **364**, 897-908.

- 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**, 127-139.
- Vincent F., Ramoni R., Spinelli S., Grolli S., Tegoni M. & Cambillau C. (2004) Crystal structure of bovine odorant binding protein in complex with odorant molecules. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3C32-3C-42.
- Vogt R. G. & Riddiford L. M. (1981) Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, **293**, 161-163.
- Vosseller K., Wells L. & Hart G. W. (2001) Nucleocytoplasmic O-glycosylation: O-GlcNAc and functional proteomics. *Biochimie*, **83**, 575-581.
- Vulliet P. R., Hall F. L., Mitchell J. P. & Hardie D. G. (1989) Identification of a novel proline-directed serine/threonine protein kinase in rat pheochromocytoma. *J. Biol. Chem.*, **264**, 16292-16298.
- Walter G. & Mumby M. (1993) Protein serine/ threonine phosphatases and cell transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1155**, 207-226.
- Wang, J. Y. & Koshland, D. E. (1978) Evidence for protein kinase activities in the prokaryote *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.*, **253**, 7605-7608.
- Wei L., Hubbard S. R., Smith R. F. and Ellis L. (1994) Protein kinase superfamily - comparisons of sequence data with three-dimensional structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 450-455.
- Wei Y., Brandazza A. & Pelosi P. (2008) Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutants of odorant-binding protein: A first step towards biosensors for environmental monitoring. *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 666-671.
- Wells L., Gao Y., Mahoney J. A., Vosseller K., Chen C., Rosen A. & Hart G. W. (2002a) Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1755-1761.
- Wells L., Vosseller K., Cole R. N., Cronshaw J. M., Matunis M. J. & Hart G. W. (2002b) Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol. Cell Proteomics*, **1**, 791-804.
- Wera S. & Hemmings B. A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem. J.*, **311**, 17-29.

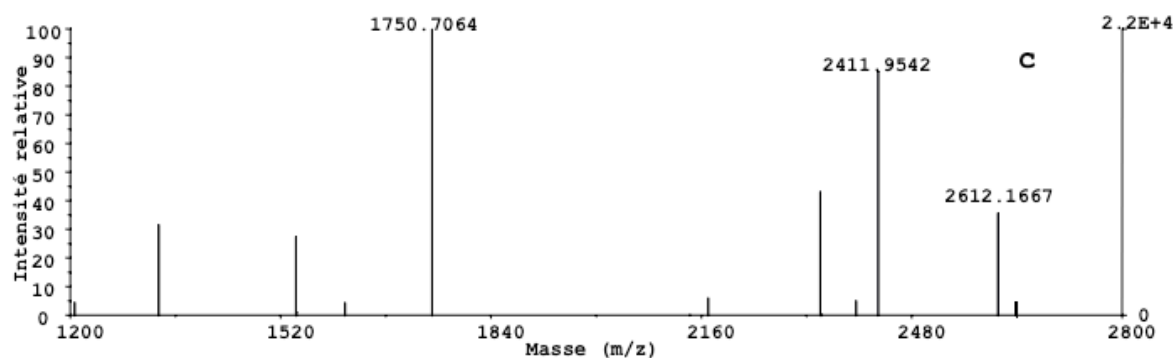
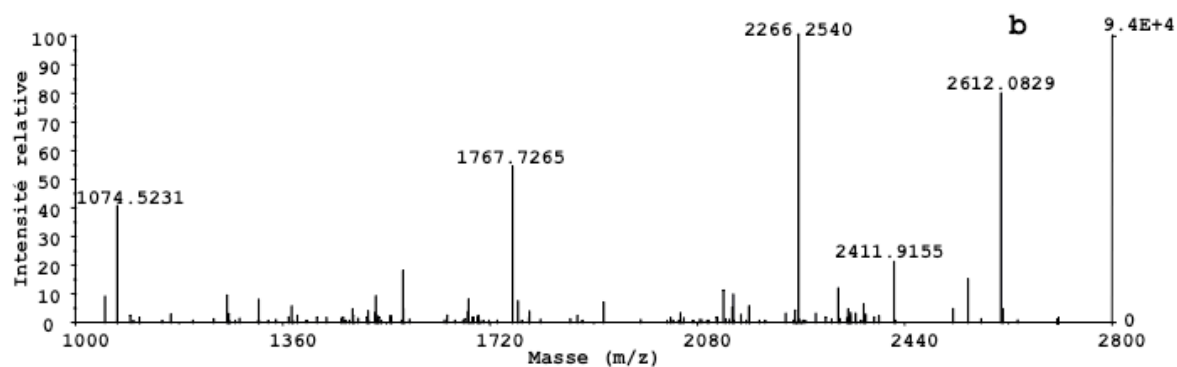
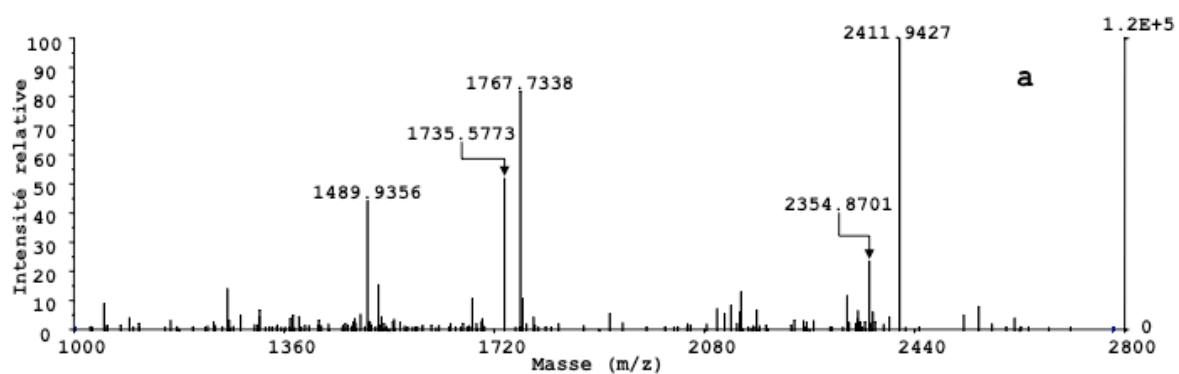
- Wojnar P., Lechner M., Merschak P. & Redl B. (2001) Molecular cloning of a novel lipocalin-1 interacting human cell membrane receptor using phage display. *J. Biol. Chem.*, **276**, 20206-20212.
- Wrabl J. O. & Grishin N. V. (2001) Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *J. Mol. Biol.*, **314**, 365-374.
- Wyatt T. D. (2009) Fifty years of pheromones. *Nature*, **457**, 262-263.
- Xu S. & Venge P. (2000) Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1482**, 298-307.
- Yang J., Goetz D., Li J. Y., Wang W., Mori K., Stelick et al., (2002) An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol. Cell*, **10**, 1045-1056.
- Yang W. H., Kim J. E., Nam H. W., Ju J. W., Kim H. S. & Cho J. W. (2006) Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 1074-1083.
- Zanotti G., Malpeli G. & Berni R. (1993) The interaction of N-ethyl retinamide with plasma retinol-binding protein (RBP) and the crystal structure of the retinol-RBP complex at 1.9 resolution. *J. Biol. Chem.*, **268**, 24243-873.
- Zhang, C. C., Jang, J., Sakr, S. and Wang, L. (2005) Protein phosphorylation on Ser, Thr and Tyr residues in cyanobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 154-166.
- Zupko K., Poria Y. & Lancet D. (1991) Immunolocalization of cytochrome P-450olf1 and P-450olf2 in rat olfactory mucosa. *Eur. J. Biochem.*, **196**, 51-58.

Annexe 1



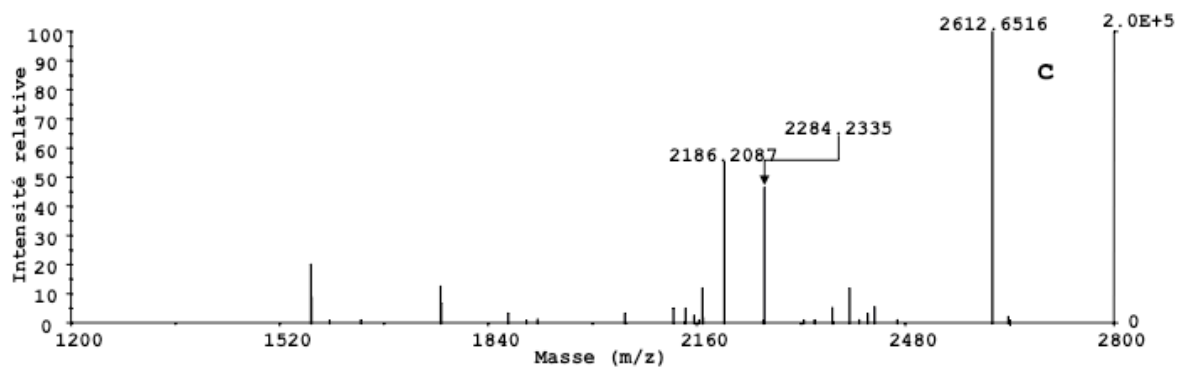
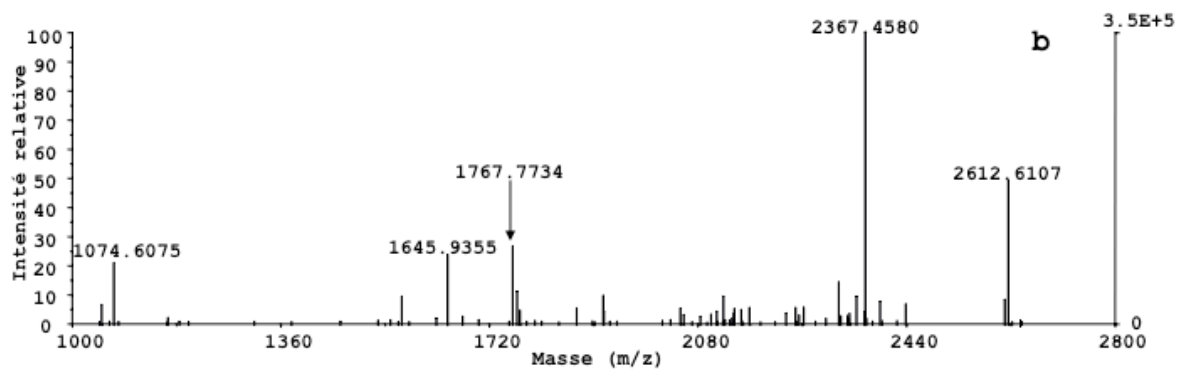
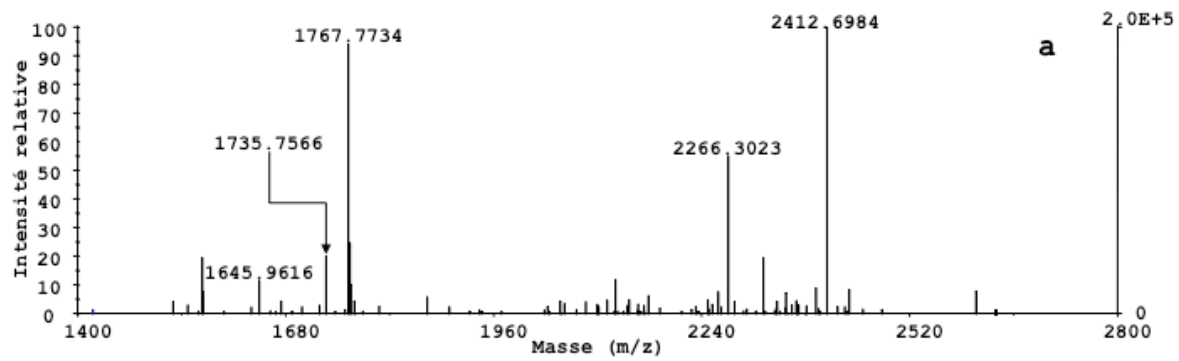
Annexe 1-A : Cartographie peptidique de la fraction 4

Spectres de masse MALDI-TOF des peptides de la fraction 4 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides ont été élués avec différents pourcentages d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).



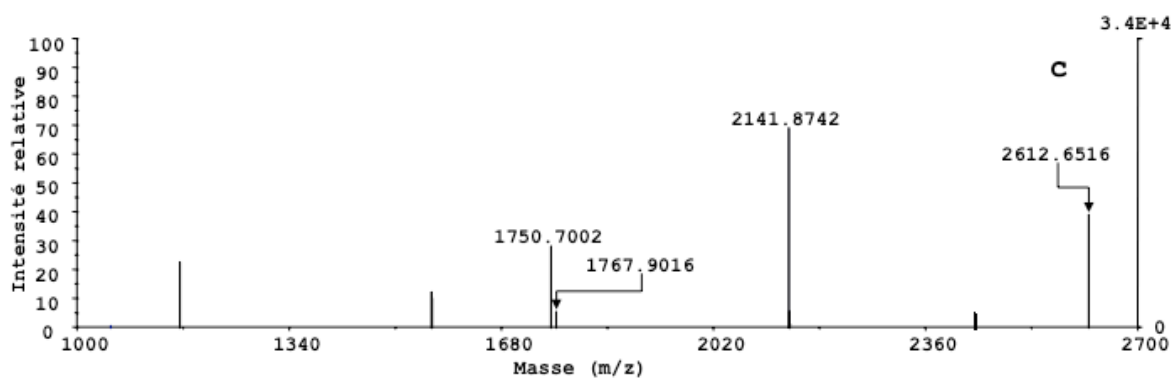
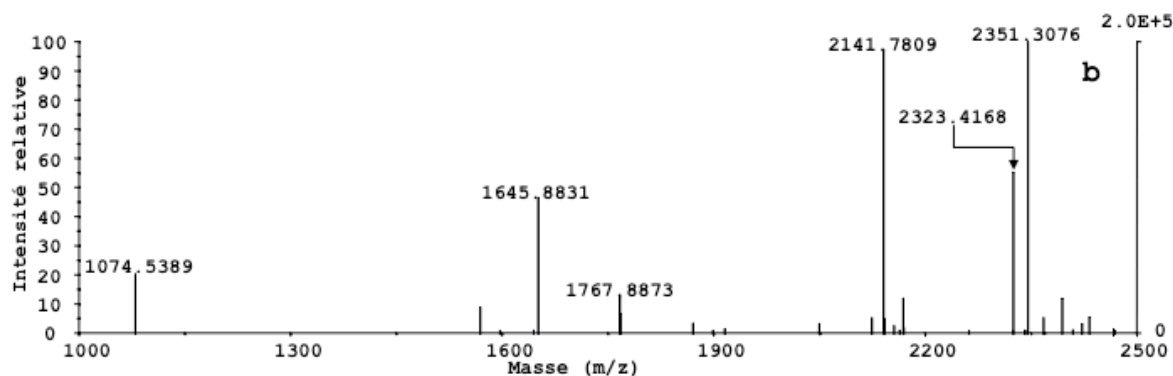
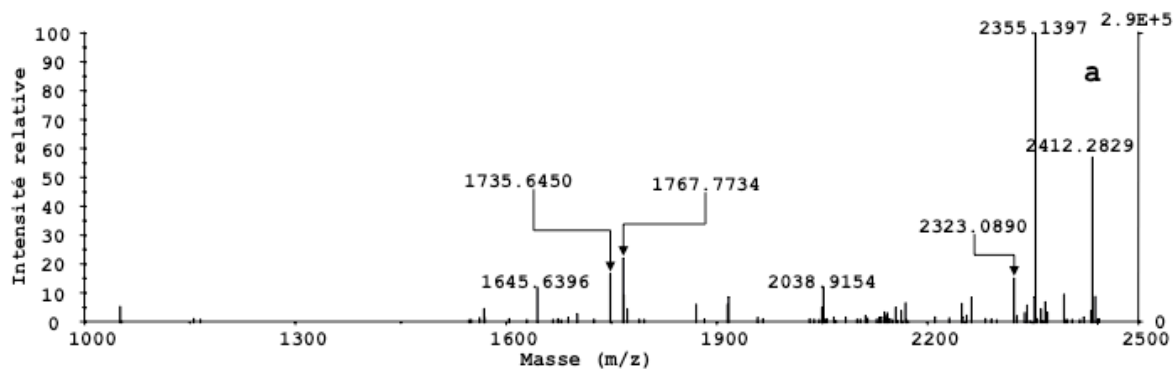
Annexe 1-B : Cartographie peptidique de la fraction 4a

Spectres de masse MALDI-TOF des peptides de la fraction 4a obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides ont été élués avec différents pourcentages d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).



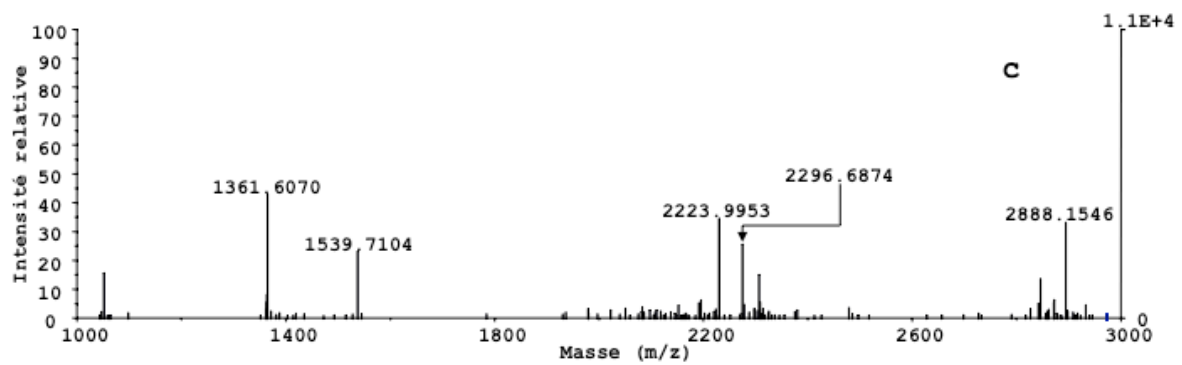
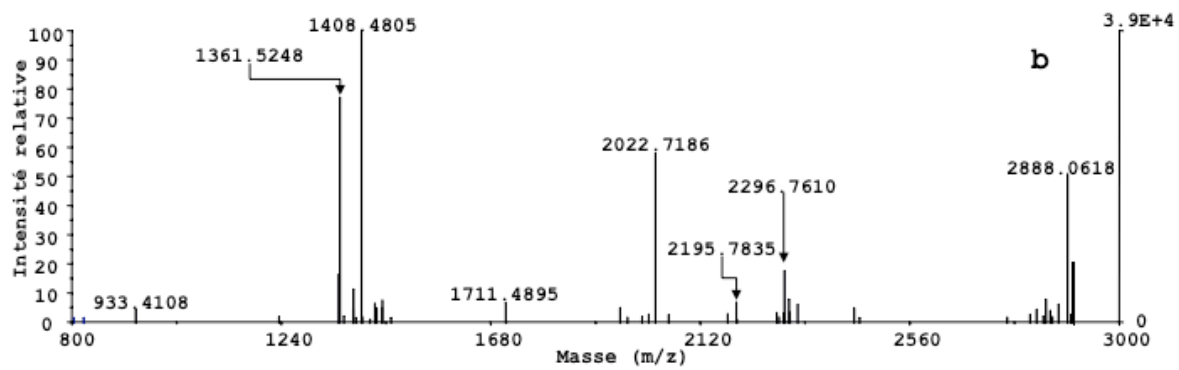
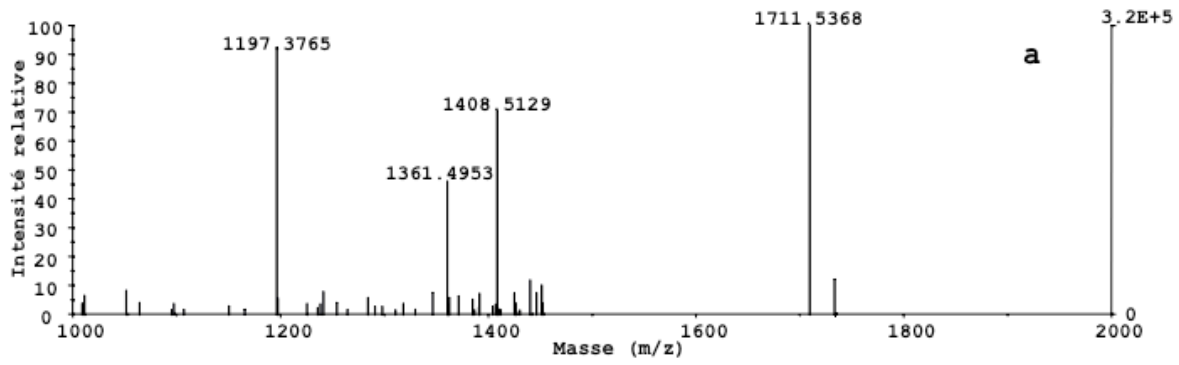
Annexe 1-C : Cartographie peptidique de la fraction 4b

Spectres de masse MALDI-TOF des peptides de la fraction 4b obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides ont été élués avec différents pourcentages d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).



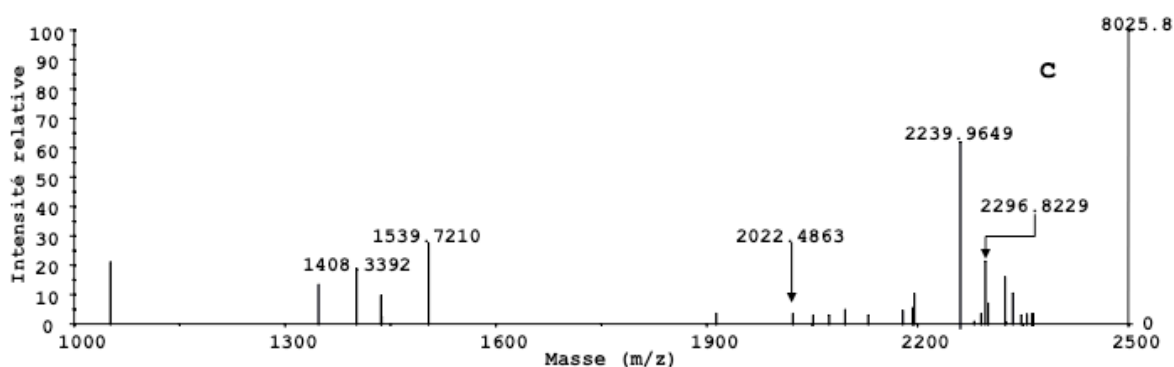
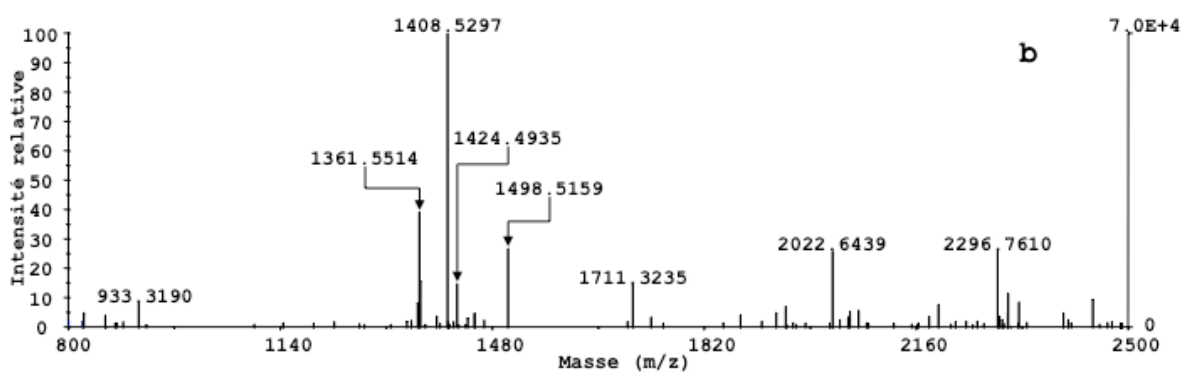
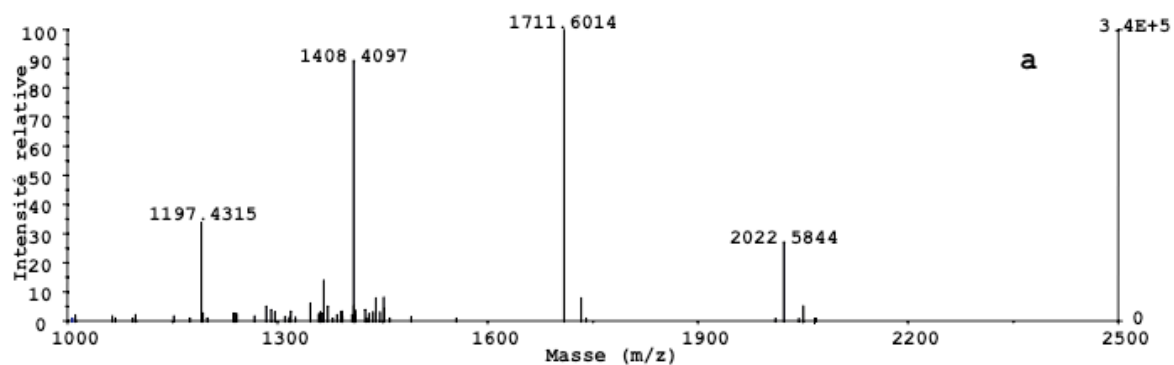
Annexe 1-D : Cartographie peptidique de la fraction 5

Spectres de masse MALDI-TOF des peptides de la fraction 5 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides ont été élués avec différents pourcentages d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).



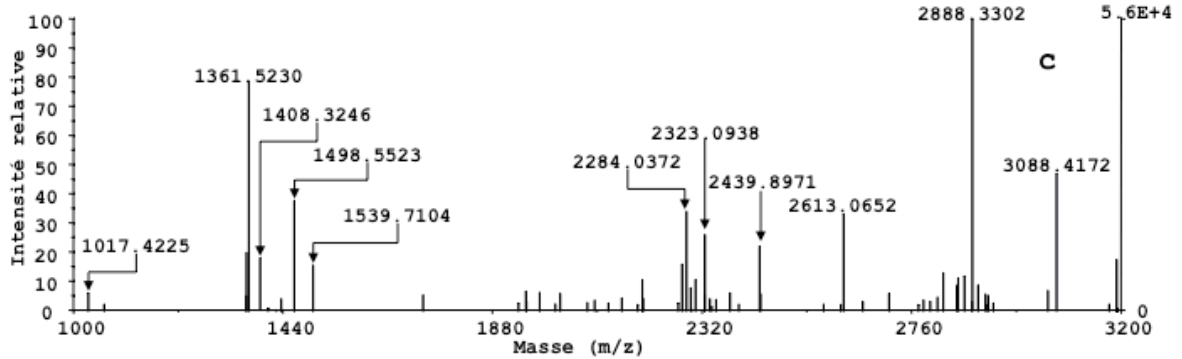
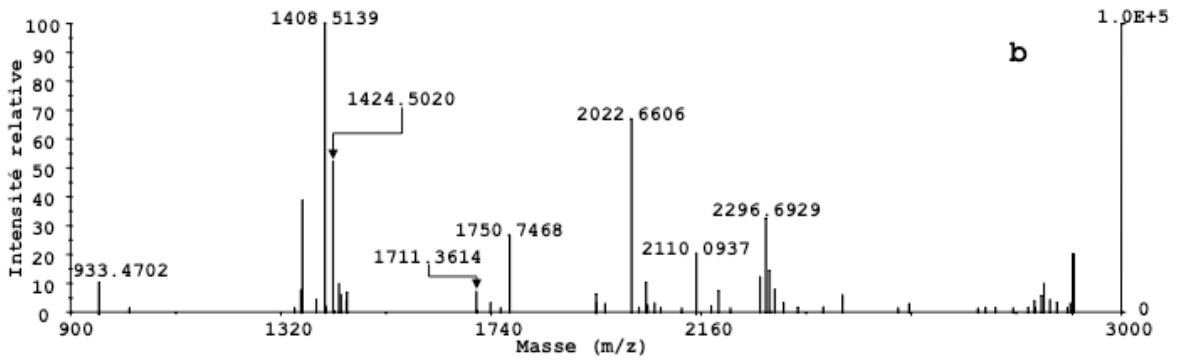
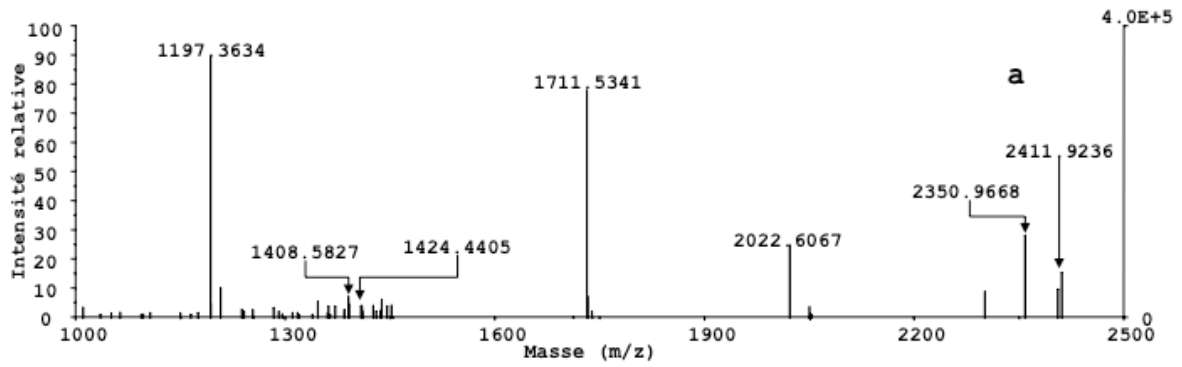
Annexe 1-E : Cartographie peptidique de la fraction 8.

Spectres de masse MALDI-TOF des peptides de la fraction 8 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides ont été élués avec différents pourcentages d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).



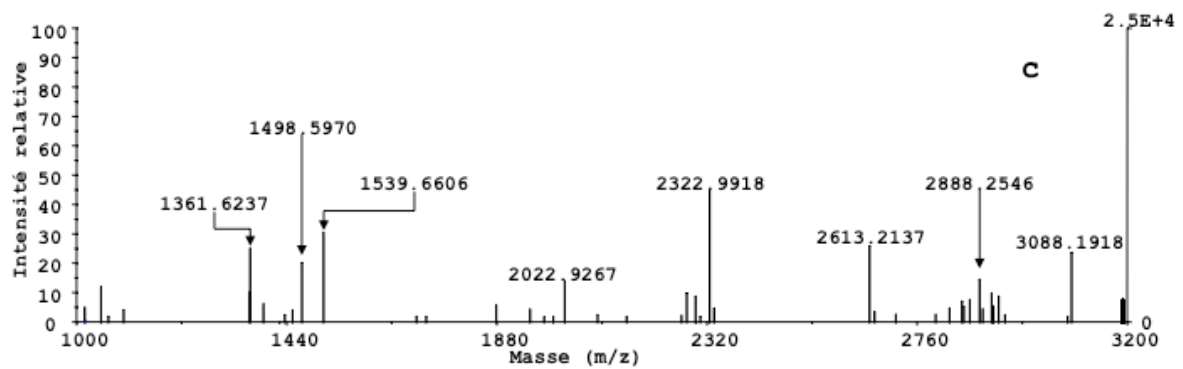
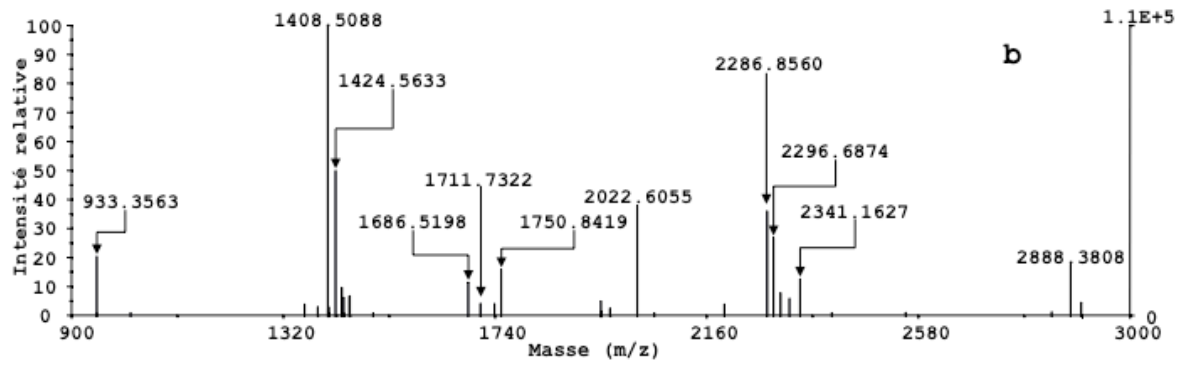
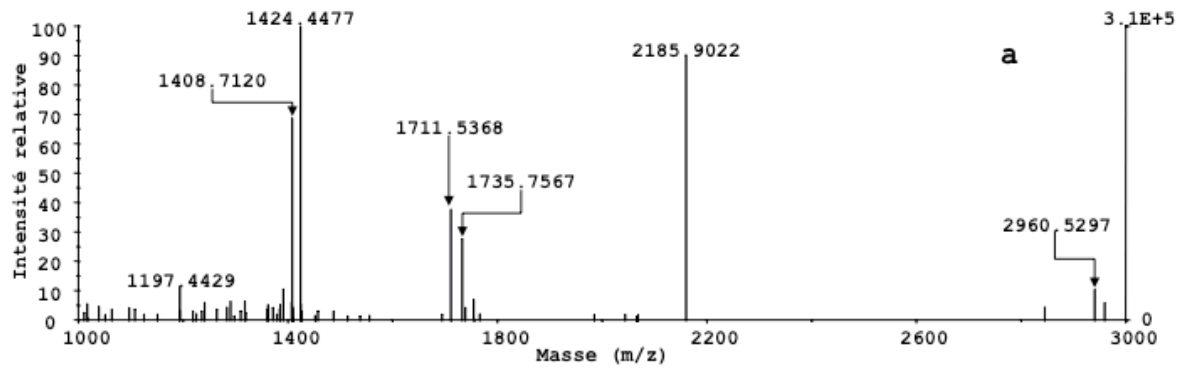
Annexe 1-F : Cartographie peptidique de la fraction 8a.

Spectres de masse MALDI-TOF des peptides de la fraction 8a obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides ont été élués avec différents pourcentages d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).



Annexe 1-G : Cartographie peptidique de la fraction 9

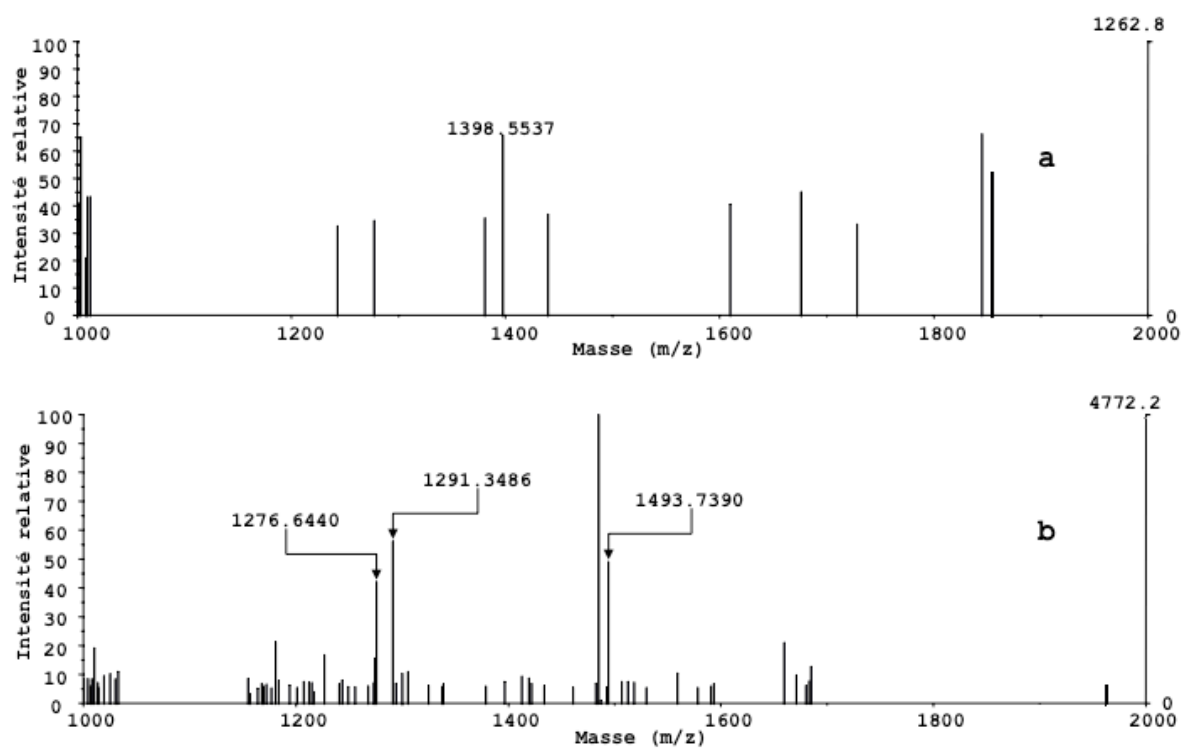
Spectres de masse MALDI-TOF des peptides de la fraction 9 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides ont été élués avec différents pourcentages d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).



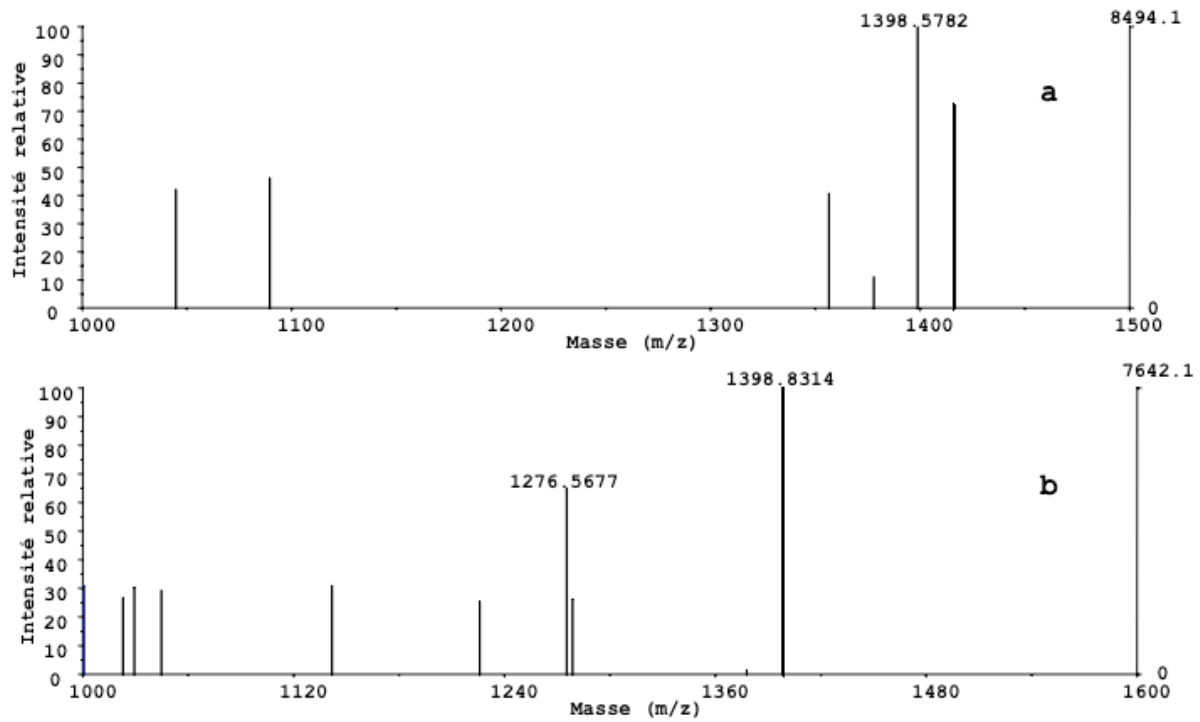
Annexe 1-H : Cartographie peptidique de la fraction 10

Spectres de masse MALDI-TOF des peptides de la fraction 10 obtenus après digestion trypsique et réduction-alkylation. Les peptides ont été élués avec différents pourcentages d'ACN : 12,5% (a), 25% (b) et 50% (c).

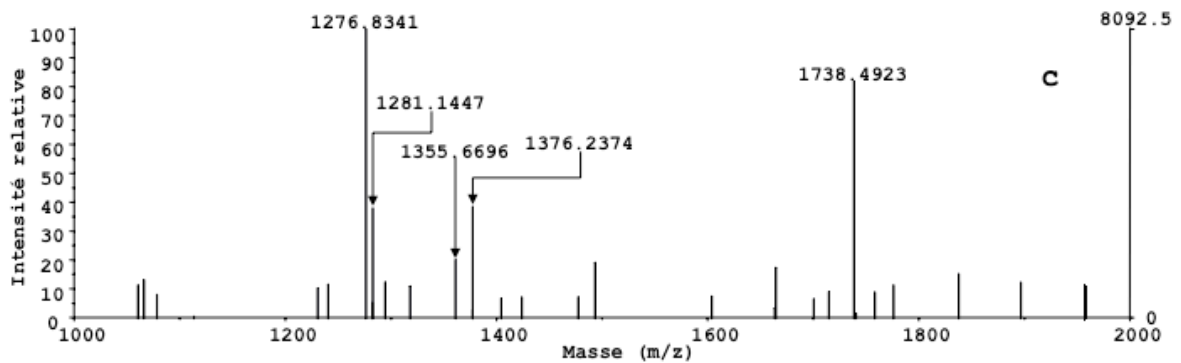
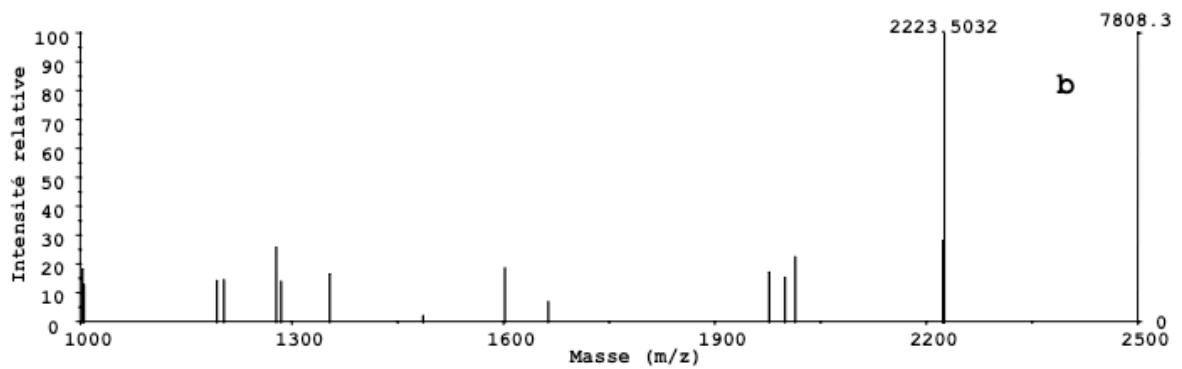
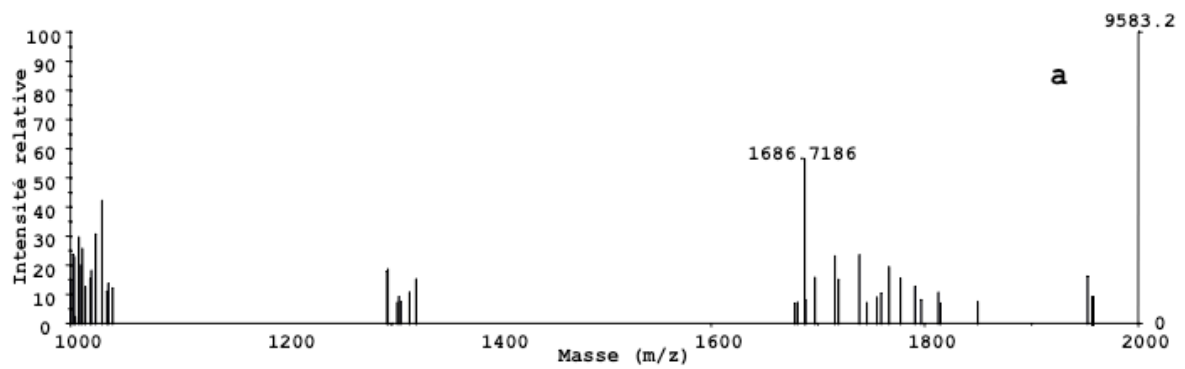
Annexe 2



Annexe 2-A : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 8.
Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 8 après BEMAD. **a** - Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T. **b** - Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T+CT

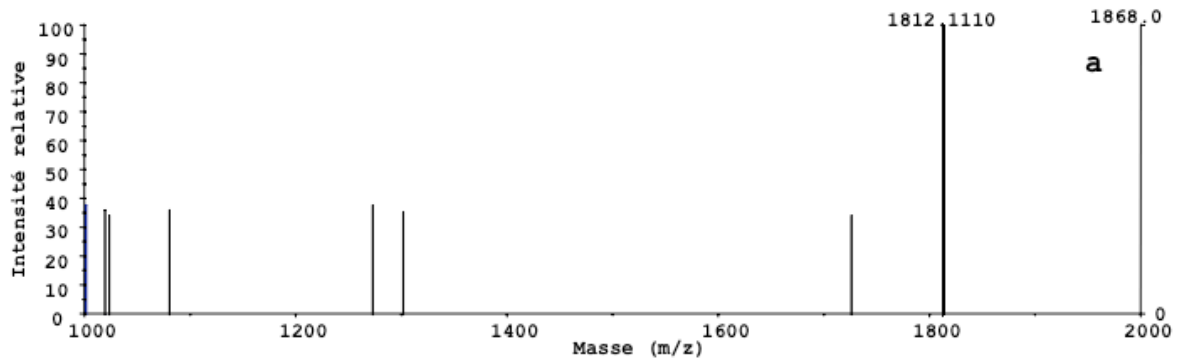


Annexe 2-B : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 8a.
 Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 8a après BEMAD. **a** - Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T. **b** - Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T+CT

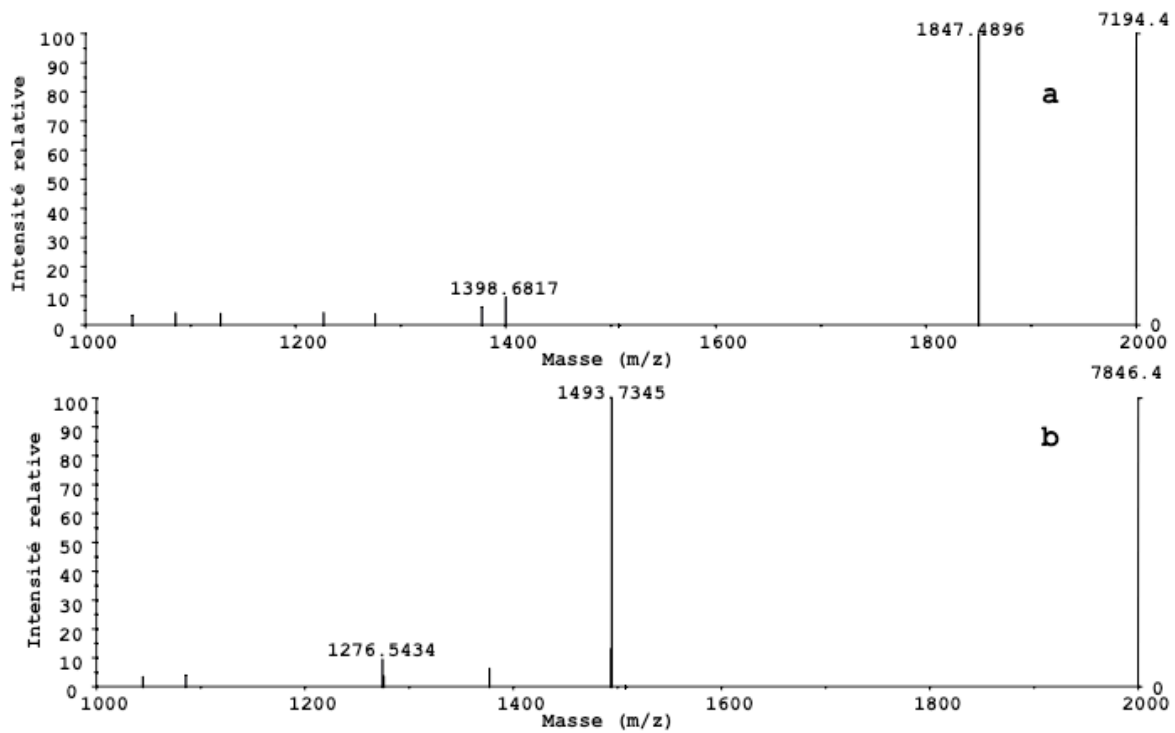


Annexe 2-C : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 9.

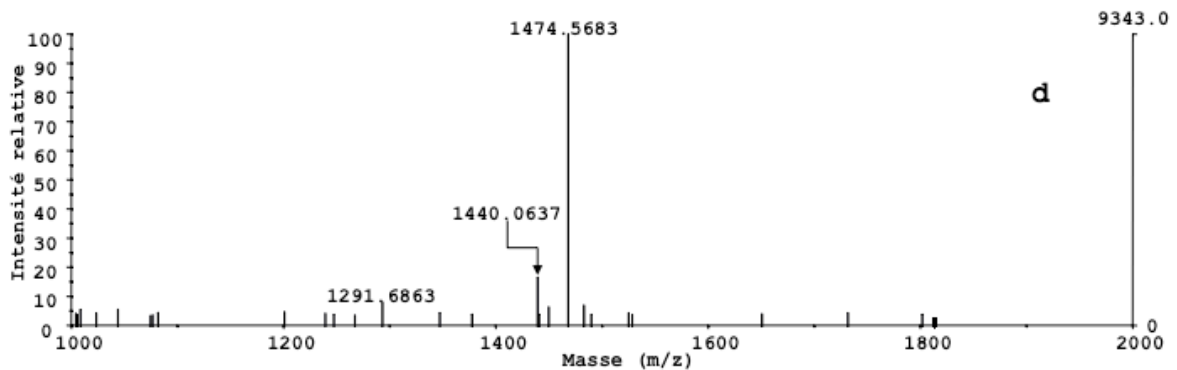
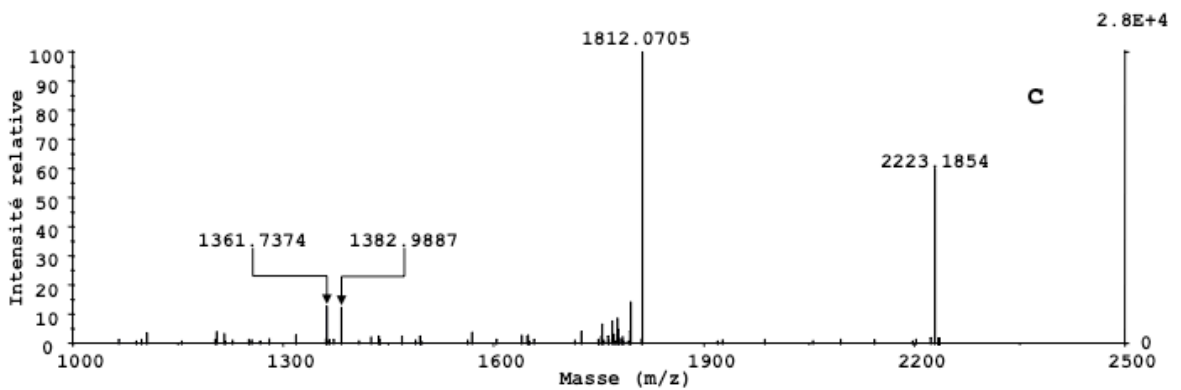
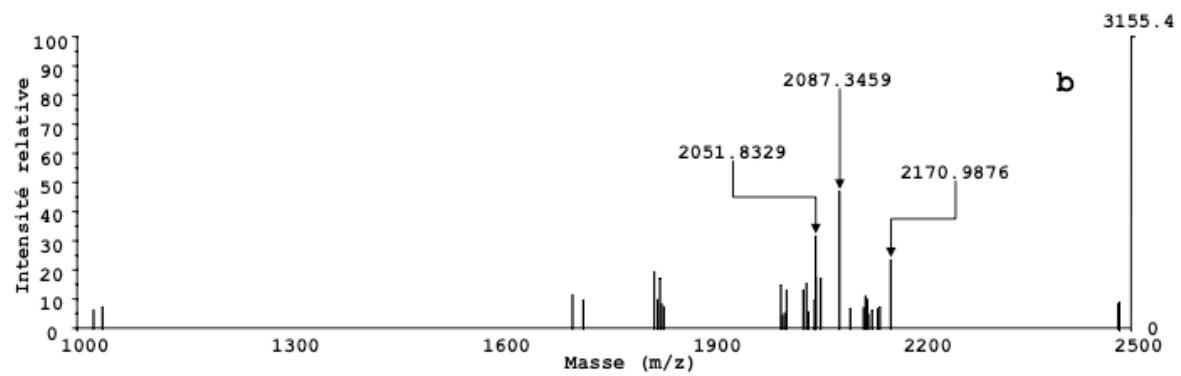
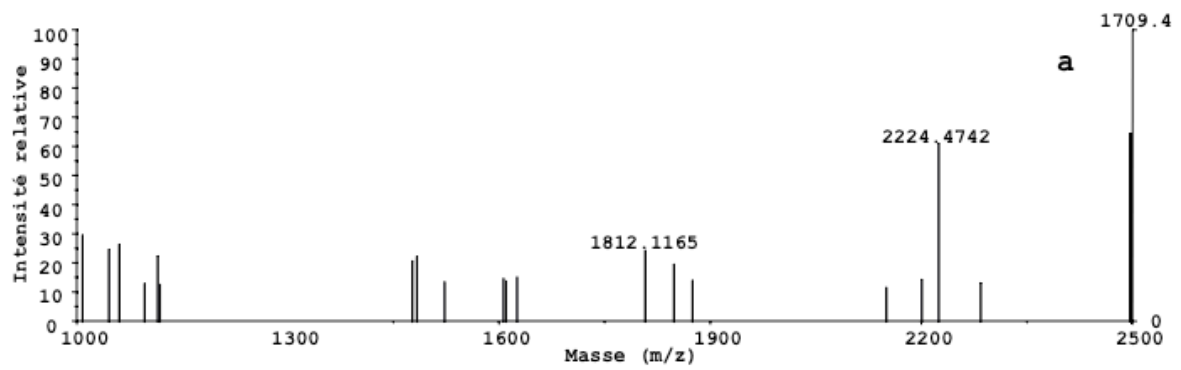
Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 9 après BEMAD. **a** - Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T. **b** - Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement CT. **c** - Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T+CT.



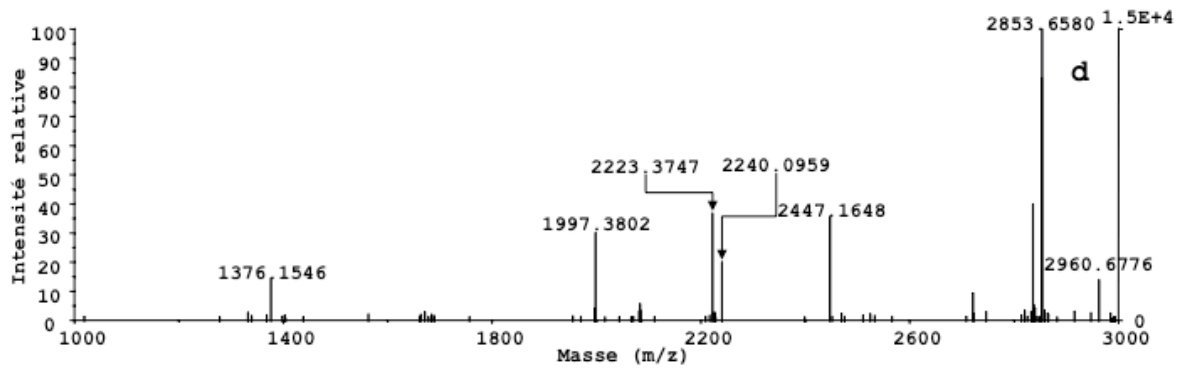
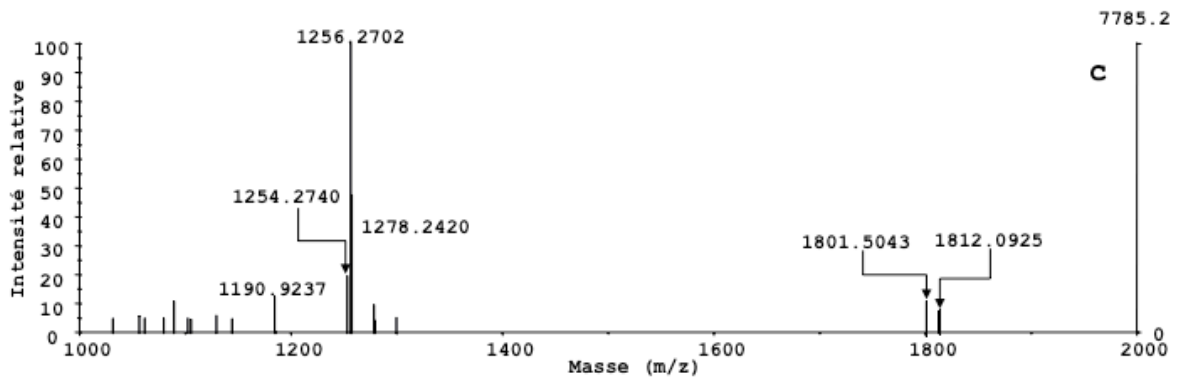
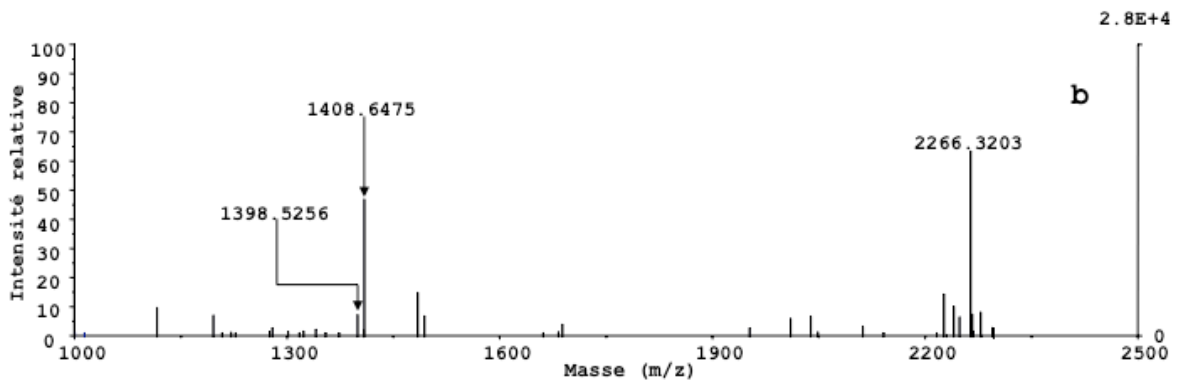
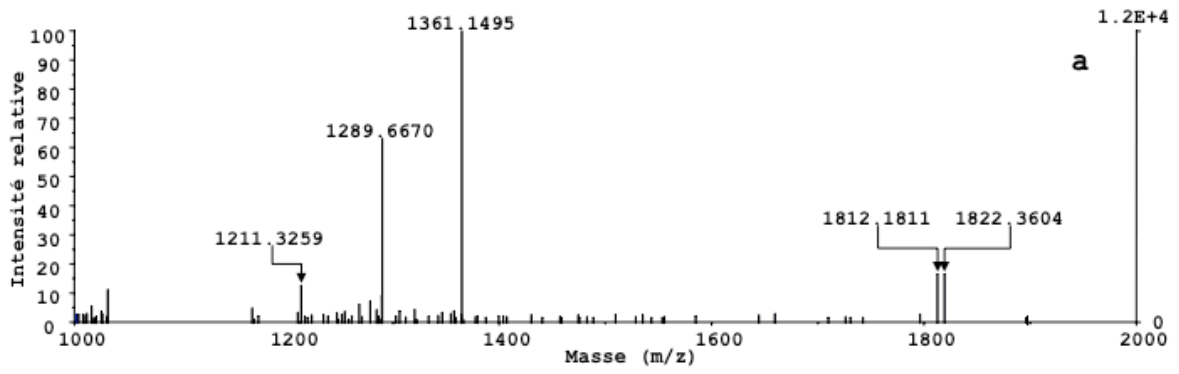
Annexe 2-D : Localisation des sites de phosphorylation de la fraction 10.
 Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 10 après BEMAD. **a** – Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T.

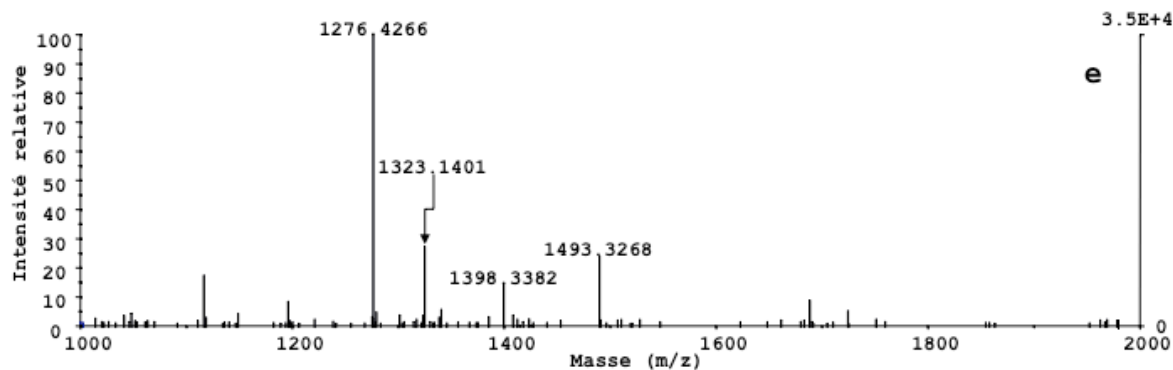


Annexe 2-E : Localisation des sites de O-N-acetylglucosaminylation de la fraction 8.
 Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 8 après BEMAD. **a** – Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T. **b** – Elution des peptides à 50% après un traitement T+CT.



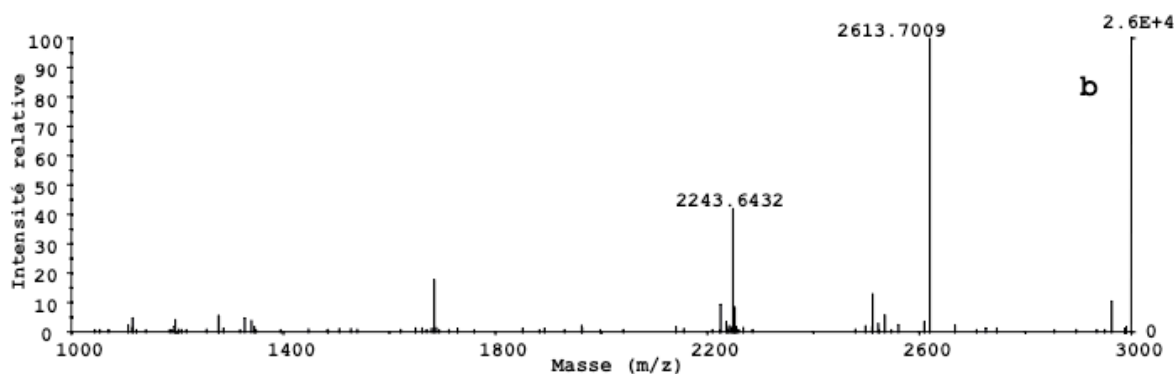
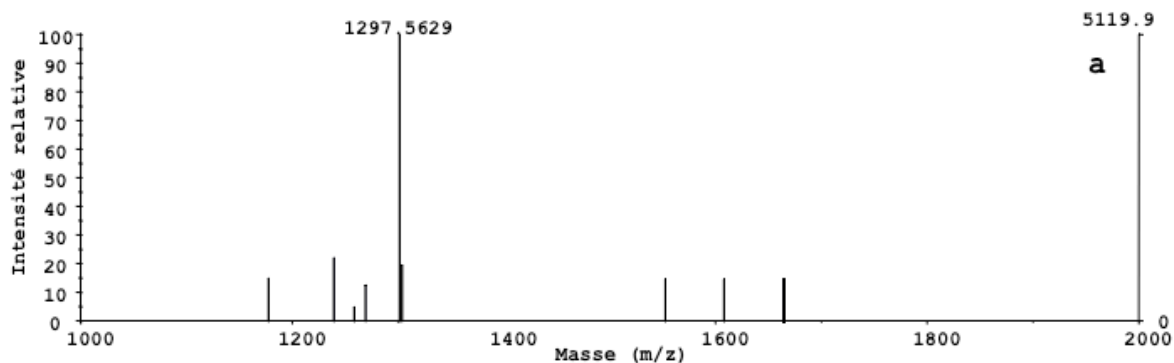
Annexe 2-F : Localisation des sites de O-N-acetylglucosaminylation de la fraction 8a.
 Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 8a après BEMAD. **a** – Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T. **b** – Elution des peptides à 25% après un traitement CT. **c** – Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T+CT. **d** – Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T+CT.

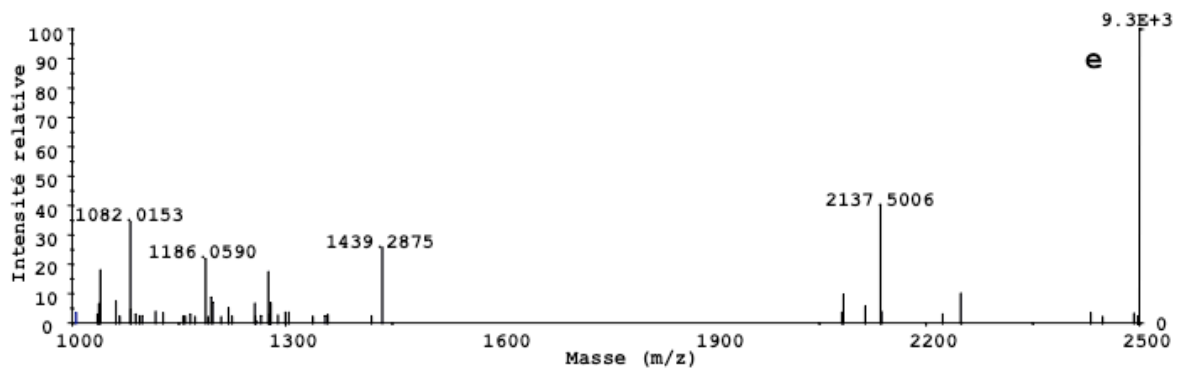
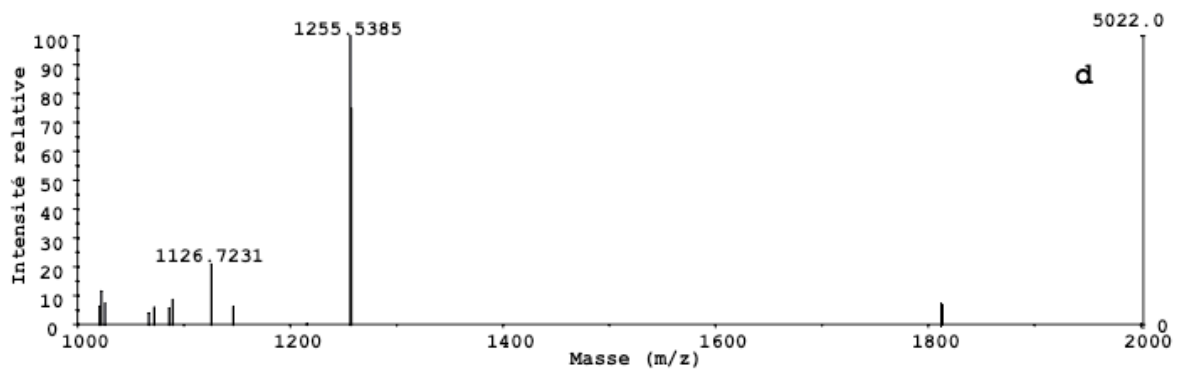
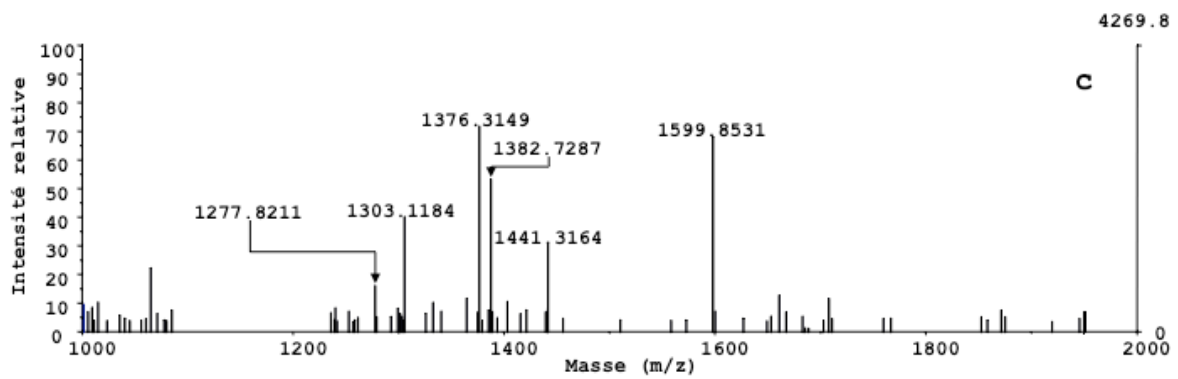




Annexe 2-G : Localisation des sites de O-N-acetylglucosaminylation de la fraction 9.

Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 9 après BEMAD. **a** - Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T. **b** - Elution des peptides à 50% après un traitement T. **c** - Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T+CT. **d** - Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T+CT. **e** - Elution des peptides à 50% d'ACN après un traitement T+CT.

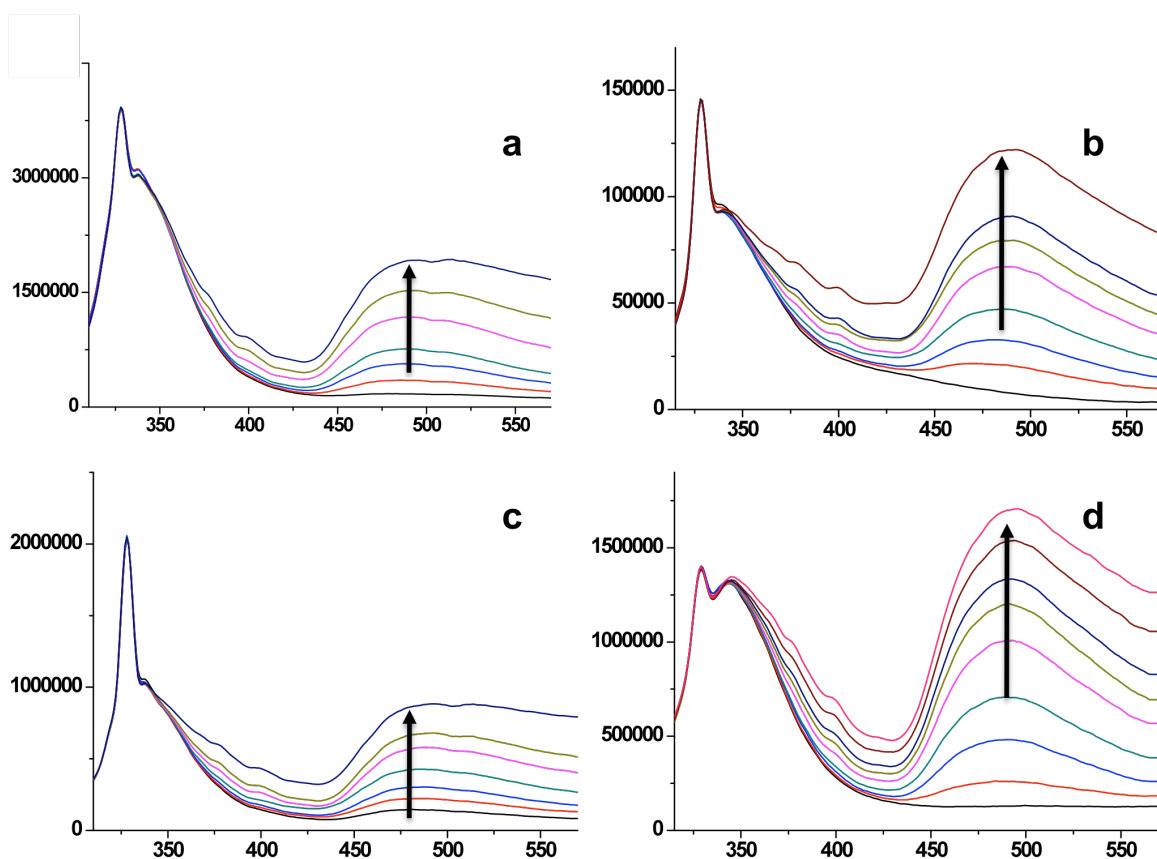




Annexe 2-H : Localisation des sites de O-N-acetylglucosamylation de la fraction 10.

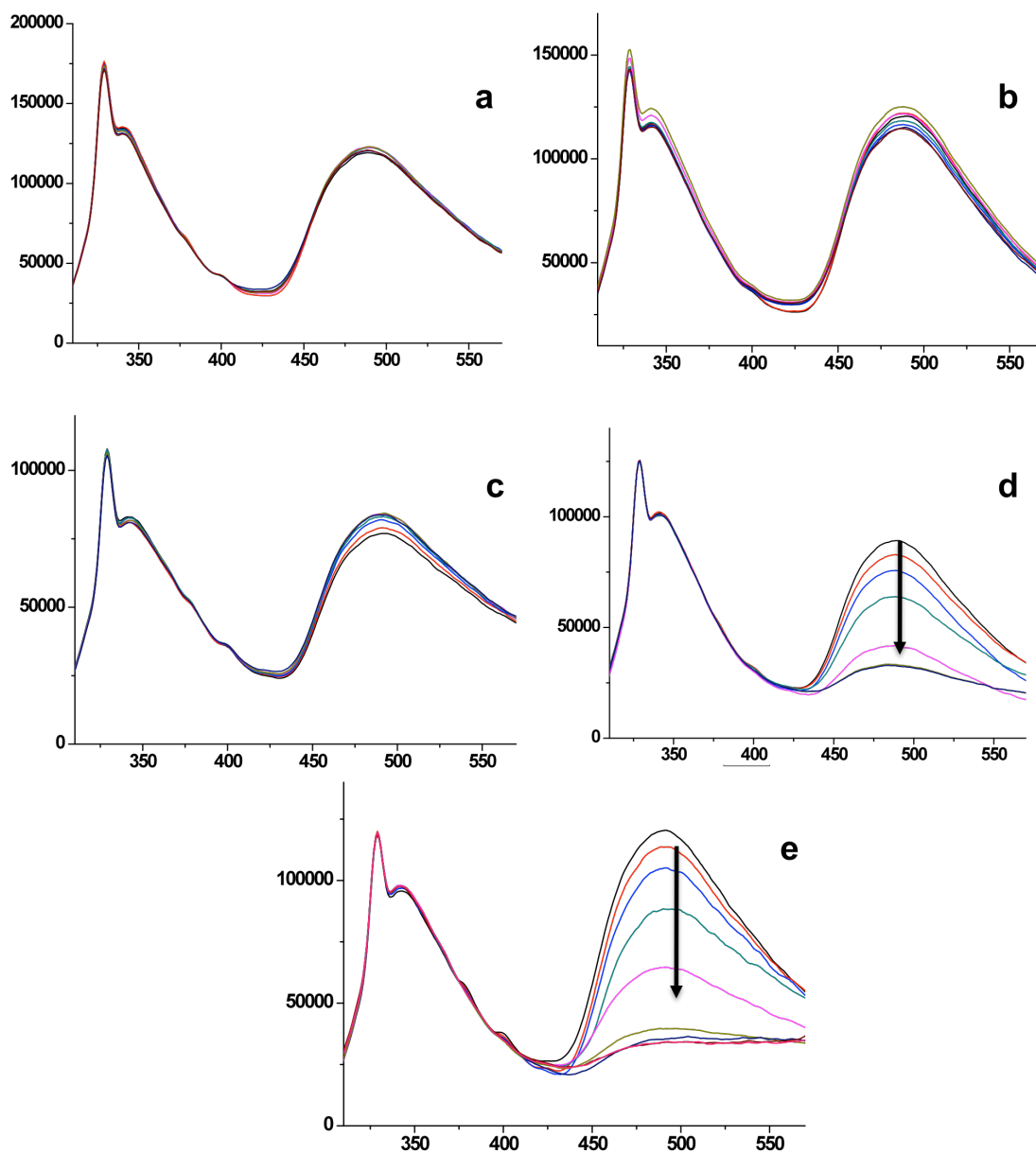
Spectres de MALDI-TOF des peptides de la fraction 10 après BEMAD. **a** - Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T. **b** - Elution des peptides à 25% après un traitement T. **c** - Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement CT. **d** - Elution des peptides à 12,5% d'ACN après un traitement T+CT. **e** - Elution des peptides à 25% d'ACN après un traitement T+CT.

Annexe 3

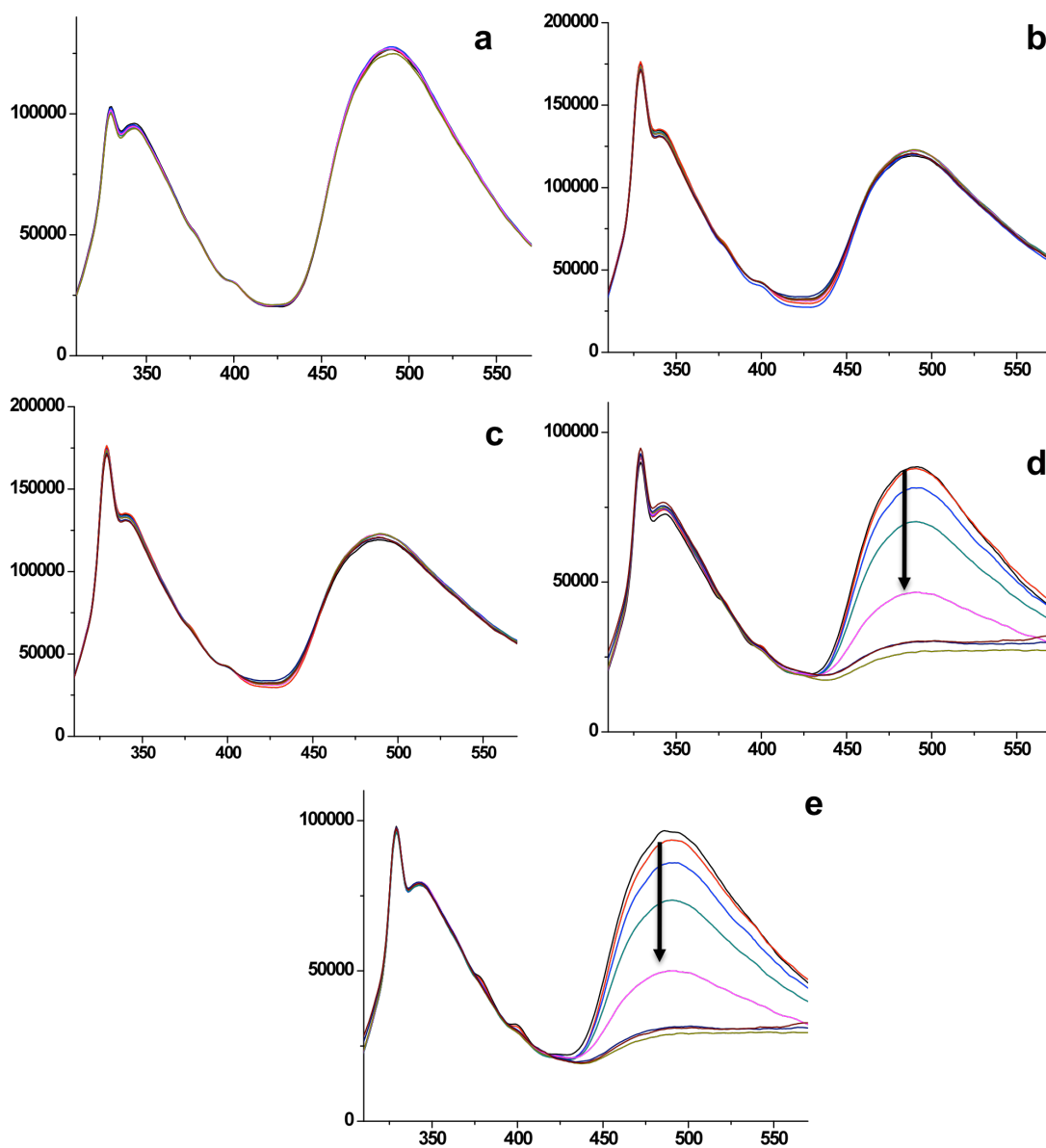


Annexe 3-A : Courbes de titration de la fraction 8 (a), la fraction 8a (b), la fraction 9 (c) et la fraction 10 (d)

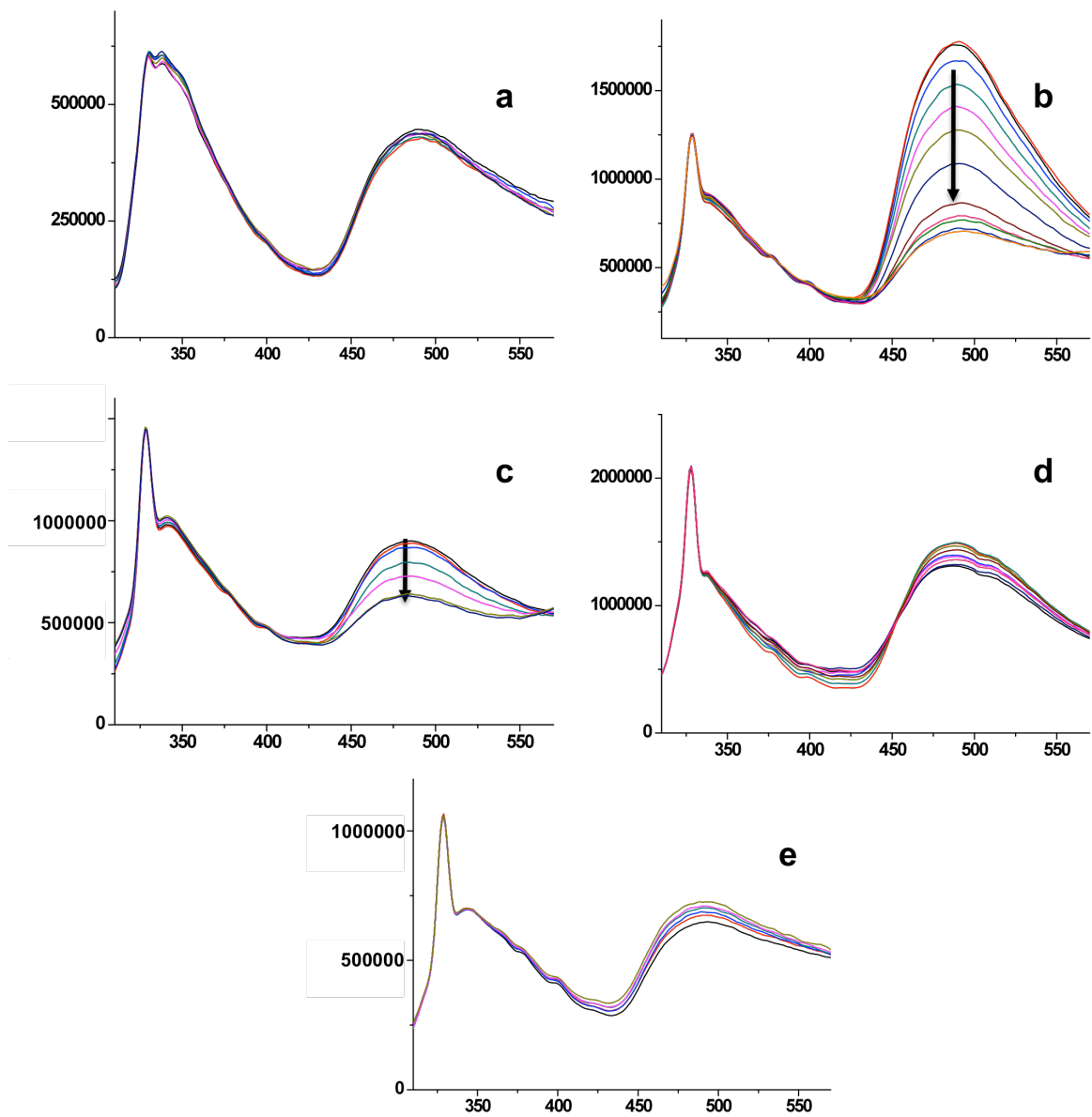
avec des concentrations croissantes d'AMA : de 0 à 6 μ M pour la fraction 8-8a et de 0 à 15 μ M pour la fraction 9-10 dans un tampon Tris



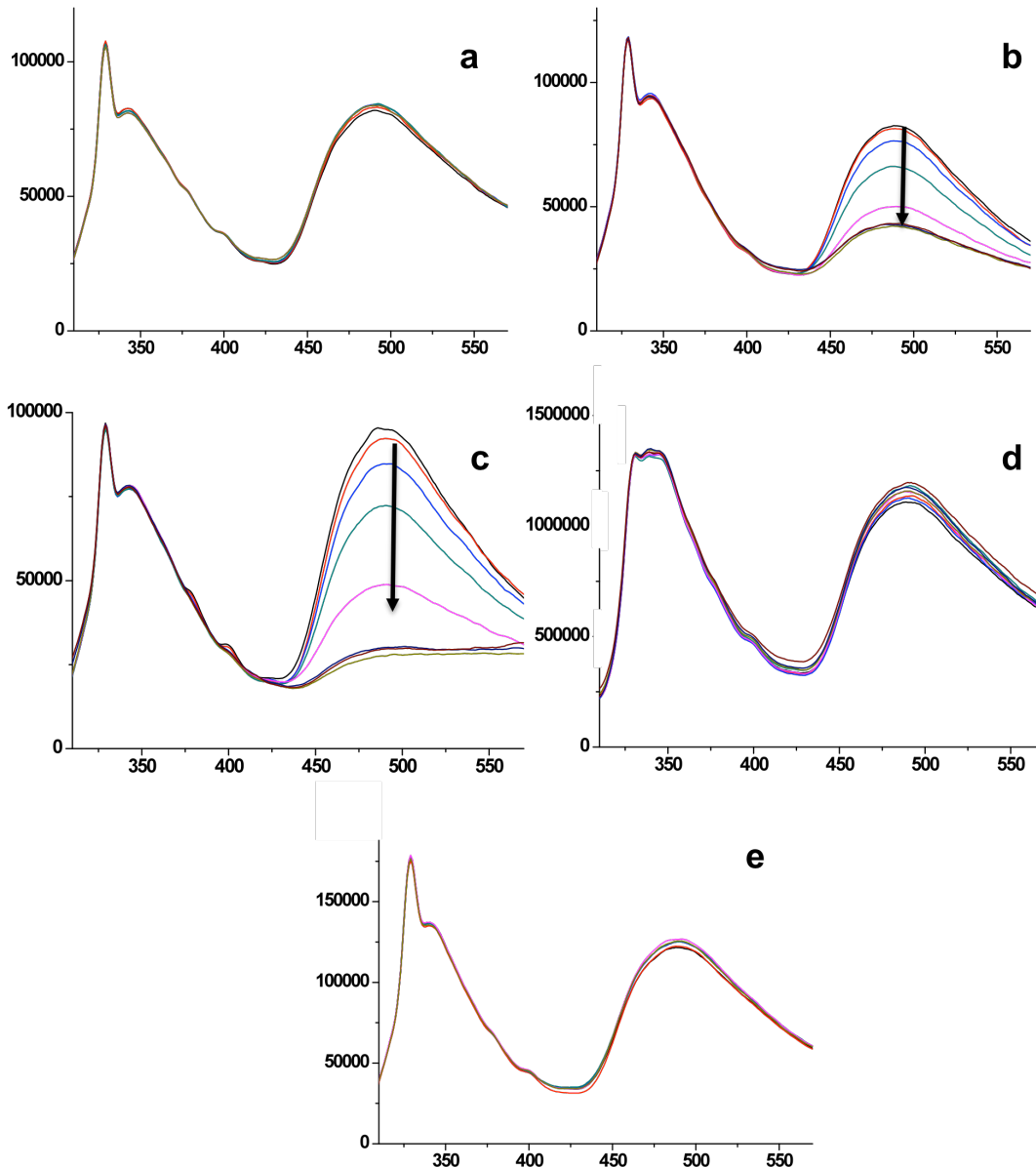
Annexe 3-B : Spectres de fluorescence des tests de compétition sur la fraction 8.
a-testostérone, *b*-androsténone, *c*-androsténol, *d*-acide palmitique et *e*- acide myristique. La concentration de la fraction est de 1 μM et celle de l'AMA de 2 μM . Le ligand est ajouté pour des concentrations croissantes de 0 à 6 μM . La flèche indique la diminution de la fluorescence concordant avec l'augmentation de la concentration du ligand.



Annexe 3-C : Spectres de fluorescence des tests de compétition sur la fraction 8a.
a-testostérone, *b*-androsténone, *c*-androsténol, *d*-acide palmitique et *e*- acide myristique. La concentration de la fraction est de 1 μ M et celle de l'AMA de 2 μ M. Le ligand est ajouté pour des concentrations croissantes de 0 à 6 μ M. La flèche indique la diminution de la fluorescence concordant avec l'augmentation de la concentration du ligand.



Annexe 3-D : Spectres de fluorescence des tests de compétition sur la fraction 9.
a-testostérone, *b*-androsténone, *c*-androsténol, *d*-acide palmitique et *e*- acide myristique. La concentration de la fraction est de 2,5 μM et celle de l'AMA de 3,75 μM. Le ligand est ajouté pour des concentrations croissantes de 0 à 15 μM. La flèche indique la diminution de la fluorescence concordant avec l'augmentation de la concentration du ligand.



Annexe 3-E : Spectres de fluorescence des tests de compétition sur la fraction 10.
a-testostérone, b-androsténone, c-androsténol, d-acide palmitique et e- acide myristique. La concentration de la fraction est de 2,5 μM et celle de l'AMA de 3,75 μM . Le ligand est ajouté pour des concentrations croissantes de 0 à 15 μM . La flèche indique la diminution de la fluorescence concordant avec l'augmentation de la concentration du ligand.

Rôle des Odorant-binding protein dans le mécanisme de transduction olfactive: implication de modifications post-traductionnelles dynamiques dans la spécificité de liaison avec les ligands**Résumé**

Les OBP sont des petites protéines solubles qui se lient avec des molécules odorantes et phéromonales. Le rôle des OBPs n'est pas complètement compris. Une hypothèse suggère que l'OBP solubilise et transporte les ligands aux récepteurs olfactifs et la liaison entre les molécules odorantes et l'OBP est non spécifique. Une autre hypothèse suggère que le complexe formé est une liaison spécifique entre une molécule odorante donnée et une OBP spécifique. Ce travail de thèse montre que les OBPs sont impliquées dans la première étape de la discrimination des odeurs. Dans un premier temps, nous avons montré l'implication de la Phe35 et la Tyr 82 dans la sortie du ligand par l'OBP. Dans un second temps, nous avons mis en évidence la présence de différentes isoformes d'OBP et de VEG qui diffèrent par les modifications post-traductionnelles (phosphorylation et GlcNAcylation) à la fois sur les protéines natives extraites de la muqueuse respiratoire et sur les protéines recombinantes produites par *P.pastoris* et CHO. Ces isoformes sont capables de discriminer des molécules odorantes et phéromonales. Les OBPs ne sont pas des transporteurs passifs car elles assurent un fin codage des molécules odorantes ou phéromonales avant l'interaction de ce complexe avec un récepteur spécifique.

Mots-clefs : olfaction, Odorant-Binding Protein, Von Ebner's Gland Protein, modifications post-traductionnelles, phosphorylation, O-N-acétylglucosaminylation, cartographie peptidique, western-blot, BEMAD, spectroscopie de fluorescence.

Résumé en anglais

OBPs are small soluble proteins that bind with odorant molecules and pheromones. The role of OBP is not completely understood. A hypothesis suggests that OBP solubilize and transport the ligands to olfactory receptors and the binding between odorant molecule and OBP is unspecific. An other hypothesis suggest that the complex formed is the specific binding between a given odorant molecule and a specific OBP. This work of thesis show that OBP are involved in the first step of odorant discrimination. Initially, we have showed the involvement of the Phe35 and Tyr 82 in the uptake of ligands by OBP. Second, we have given rise to the presence of various isoform of OBP and VEG that differ by post-translational modifications (phosphorylation and GlcNAcylation) both on natives proteins extract of respiratory mucosa and on recombinants proteins produce by *P. pastoris* and CHO. These isoforms are able to discriminate of odorant molecules and pheromones. OBPs are not passives carriers because they ensure a fine coding of odorant molecules and pheromones before interaction of this complex with specific receptor.

Key-words: olfaction, odorant-binding protein, Von Ebner's Gland Protein, post-translational modifications, phosphorylation, O-N-acetylglucosaminylation, peptide mapping, western-blot, BEMAD, fluorescence spectroscopy.