



Groupe de travail «modélisation»

(Animation J.-P. Rospars)

Une quinzaine de personnes est intéressée par le groupe de travail "Modélisation" à Dijon (Elisabeth Guichard et Anne Tromelin), à Grignon (Michèle Marin, Eric Latrille, Christian Trelea, Isabelle Souchon), à Jouy-en-Josas (Hélène Débat, Marie-Madeleine Delage, Claude Nespoulous, Kiên Kiêu, Edit Pajot, Jean-Claude Pernollet, Alain Trubuil), à Lausanne (Nathalie Martin), à Lyon (Patricia et André Duchamp, Michel Chaput, CNRS), à Marseille (Olivier Clot-Faybesse, CNRS), à Reims (Olivier Vitrac), à Tours (Daniel Guillaume) et à Versailles (Emmanuelle Jacquin, Philippe Lucas, Michel Renou, Jean-Pierre Rospars et Sylvia Anton).

Les recherches entreprises faisant appel à la modélisation sont fort diverses. Tous les niveaux d'investigations (arômes, réception, transduction, codage périphérique et central, psychophysique etc.) sont abordés, avec une concentration des efforts sur le niveau réception-transduction. Deux ou trois projets seront élaborés autour de la modélisation moléculaire (des ligands et des protéines, Odorant-Binding Proteins et récepteurs), du codage nerveux au sens large (transduction, neurophysiologie, psychophysique, problème des mélanges) et du transfert de composés.

Une réunion a eu lieu à Versailles (le 11 mars 2004) pour faire le point des travaux en cours et prévus, préciser les projets ci-dessus et faire émerger de nouveaux contacts ou collaborations entre les protagonistes, suivant 3 axes de travail : "modélisation moléculaire", "transfert et transduction" et "réponses aux mélanges".

→ lire le compte-rendu page2

AROMAGRI

Groupe de travail "Modélisation"

Compte-rendu de la réunion du Jeudi 11 mars 2004
Unité de Phytopharmacie et Médiateurs chimiques, INRA Versailles
Animateur : J.-P. Rospars

Sommaire

1. Synthèse (J.-P. Rospars)
2. Contribution du groupe thématique *Modélisation moléculaire* (E. Pajot)
3. Contribution du groupe thématique *Transfert et transduction* (J.-P. Rospars)
4. Contribution du groupe thématique *Codage des odeurs complexes (mélanges)* (P. Duchamp-Viret)

1. SYNTHÈSE

Unités impliquées (8)

UMR sur les Arômes, INRA Dijon : Anne Tromelin, Thierry Thomas-Danguin

UR Biométrie et Intelligence artificielle, INRA Jouy-en-Josas : Kiên Kiêu, Jean-Pierre Rospars²

UR Mathématiques, Informatique et Génôme, INRA Jouy-en-Josas : Jean-François Gibrat

UR Neurobiologie de l'Olfaction et de la Prise Alimentaire, INRA Jouy-en-Josas : Hélène Débat, Claude Nespoulous, Edith Pajot, Jean-Claude Pernollet

UMR Neurosciences et Systèmes sensoriels, Université Lyon 1 : Patricia Duchamp-Viret

UMR Fractionnement des Agro-ressources et Emballages, INRA Reims : Jérôme Lezervant, Olivier Vitrac

UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, INRA-INAPG Thiverval-Grignon : Eric Latrille, Nathalie Martin, Isabelle Souchon, Cristian Trelea

UR Phytopharmacie et Médiateurs chimiques, INRA Versailles : Mathieu Coppey (+ Paris 6), Emmanuelle Jacquin, Philippe Lucas, Michel Renou, Jean-Pierre Rospars¹

Groupes thématiques

Trois groupes thématiques ont été constitués qui regroupent naturellement l'ensemble des recherches conduites par les participants :

1. Le groupe "*Modélisation moléculaire*" dont les recherches portent sur les interactions ligands-protéines (arôme- β -lactoglobuline, odorant-OBP et odorant-récepteur).
2. Le groupe "*Transfert et transduction*" qui étudie les mouvements moléculaires, notamment d'arômes et de protéines, dans divers milieux (aliments et emballage pour les transferts ; membrane et cytoplasme pour la transduction olfactive) à l'aide de méthodes physico-mathématiques communes.
3. Le groupe "*Mélange*" comporte des neurophysiologistes et des psychophysiciens qui s'intéressent aux réponses des neurones récepteurs olfactifs ou de sujets humains lors de stimulation par des mélanges binaires d'odorants, voire plus complexes (odeurs alimentaires).

Ces trois groupes correspondent à des approches complémentaires et partiellement chevauchantes qui se distinguent par les méthodes de modélisation à mettre en œuvre et, en partie, par le niveau d'investigation : submoléculaire pour le premier groupe, multimoléculaire pour le second, cellulaire ou perceptif (intégré) pour le troisième. Les objectifs et méthodes mises en œuvre sont résumés ci-après.

Demandes de soutien

Les travaux déjà réalisés et publiés montrent que les trois groupes ont atteint un très bon niveau technique à la fois en expérimentation et en modélisation. En particulier, les progrès sont actuellement limités par le manque de personnel en modélisation, notamment en modélisation moléculaire et de la transduction. Un soutien de bon niveau (post-doctorant ou doctorant) dans ces secteurs aurait des conséquences très positives pour l'ensemble des recherches présentées ici.

2. CONTRIBUTION DU GROUPE THEMATIQUE MODELISATION MOLECULAIRE

Equipes impliquées dans ce groupe thématique

UR Mathématiques, Informatique et Génome (MIG), INRA Jouy-en-Josas : Jean-François GIBRAT (gibrat@diamant.jouy.inra.fr), Antoine MARIN (antoine.marin@jouy.inra.fr),

UR Génétique et Physiologie de la Lactation (GPL), INRA Jouy-en-Josas : Marie-Madeleine DELAGE (mmdelage@diamant.jouy.inra.fr)

UR Neurobiologie de l'Olfaction et de la Prise Alimentaire (NOPA), INRA Jouy-en-Josas :

- Récepteurs et Communication Cellulaire (RCC) : Edith PAJOT (pajot@diamant.jouy.inra.fr), Roland SALESSE (salesse@diamant.jouy.inra.fr)

- Biochimie de l'Olfaction et de la Gustation (BOG) : Hélène DEBAT (hdebat@jouy.inra.fr), Claude NESPOULOUS (nespoulo@jouy.inra.fr), Jean-Claude PERNOLLET (pernelle@jouy.inra.fr),

UMR sur les Arômes, INRA Dijon : Anne TROMELIN (Anne.Tromelin@dijon.inra.fr), Thierry THOMAS-DANGUIN (Thierry.Thomas-Danguin@dijon.inra.fr)

UMR Fractionnement des Agro-ressources et Emballages, INRA Reims : Jérôme Lezervant, Olivier Vitrac (olivier.vitrac@reims.inra.fr)

UR Phytopharmacie et Médiateurs chimiques, INRA Versailles : Emmanuelle Jacquin (jacquin@versailles.inra.fr), Jean-Pierre Rospars (rospars@versailles.inra.fr).

Les 3 premières unités sont parties prenantes dans le projet proposé.

Objectifs

La modalité sensorielle olfactive fait intervenir pour la réception des signaux odorants 3 composants principaux : les molécules odorantes, volatiles et hydrophobes, sont transportées à travers le mucus aqueux tapissant l'épithélium olfactif par les Odorant Binding Proteins, jusqu'aux récepteurs olfactifs portés par les cils olfactifs des neurones sensoriels. La modélisation de l'interaction entre odorants ou "arômes" et protéines de transport permet de proposer un modèle capable d'expliquer l'affinité des arômes pour les OBPs selon certaines caractéristiques chimiques. Une approche structurale reposant sur la modélisation et la dynamique moléculaire des OBPs permet d'accéder aux informations concernant la protéine et les interactions protéine-odorant (docking), démarche validable par mutagenèse dirigée, pour comprendre puis prédire l'affinité de la protéine pour un ligand donné. De plus, des corrélations entre seuils de perception en analyse sensorielle et activité de fixation de l'OBP permettent d'aborder la prédiction de ces seuils de détection. Enfin, la modélisation moléculaire des récepteurs olfactifs et l'identification de résidus importants pour la reconnaissance des ligands pourront constituer une aide au criblage expérimental fonctionnel (fonction chimique, encombrement stérique,...). Les réponses fonctionnelles déjà connues, ainsi que la mutagenèse dirigée de certains résidus serviront à tester/valider leur rôle dans la fixation des ligands.

Méthodes

1) Modélisation de l'interaction arôme-protéine

L'étude est fondée sur les interactions des arômes avec la β -lactoglobuline, protéine de la famille des lipocalines comme les OBPs. L'analyse des constantes d'affinité pour 35 arômes de différentes classes chimiques met en évidence, en plus de l'hydrophobicité, d'autres modalités d'interactions. Au sein des différents groupes de composés considérés, des modèles peuvent être proposés sur la base de descripteurs moléculaires QSAR variés (caractéristiques électroniques, spatiales, structurales, topographiques, thermodynamiques, ...) par Catalyst, qui permettent de rendre compte de l'ensemble des affinités relevées expérimentalement.

Deux sites de liaison de spécificité différente coexistent sur la β -lactoglobuline. Il s'agit maintenant de pratiquer des études de docking d'arômes sur la β -lactoglobuline pour poursuivre l'étude 3D QSAR des interactions entre les arômes et les protéines.

2) Interaction odorant-OBP : modélisation et prédiction

Dans le cadre des relations structure-fonction des protéines impliquées dans la première étape de la transmission du signal, l'étude de la spécificité de reconnaissance des odeurs par les OBPs et de ses bases moléculaires nécessite de disposer de leur structure tridimensionnelle. La modélisation des OBP a été menée à partir de la structure de 5 lipocalines ayant une homologie de séquence suffisante. Les modèles sont validés par mutagenèse dirigée et par étude de leur structure en solution par spectroscopie UV différentielle et mesures de pK. Le docking OBP-ligand considère les molécules rigides et fournit les complexes de plus basse énergie, la position du ligand la plus probable étant obtenue par dynamique moléculaire. La prise en compte de la flexibilité des ligands nécessite des moyens plus importants, d'où une collaboration à Paris XI (Orsay).

De plus, une approche consistant à relier les études biochimiques et structurales (activité de fixation) sur une OBP humaine à des analyses sensorielles (seuils de perception) représente un aspect très important du programme pour répondre à la question fondamentale du rôle des OBPs dans la perception des odeurs (abaissement du seuil de détection) et d'aborder la prédiction de ces seuils de détection chez l'homme.

3) Modélisation de récepteurs olfactifs - Interaction ligand odorant-récepteur olfactif : docking et prédiction

La plupart des récepteurs olfactifs étant orphelins, et l'espace des odorants à tester pour mettre en évidence un ligand préférentiel riche de millions de produits, une modélisation moléculaire pourrait apporter une aide au criblage expérimental fonctionnel. Des modèles précis de récepteurs olfactifs peuvent être réalisés à partir de la structure tridimensionnelle de la rhodopsine bovine déterminée aux RX, protéine homologue aux récepteurs à 7 segments transmembranaires du même groupe I (modélisations déjà obtenues sur plusieurs récepteurs), par des programmes classiques ou par reconnaissance de repliements (threading), donnant ainsi accès à la structure de la poche de liaison du ligand entre les hélices transmembranaires et à l'identification des résidus importants pour la reconnaissance des ligands. Divers types de simulations informatiques permettent ensuite d'analyser ces modèles pour comprendre les mécanismes moléculaires. Les études d'amarrage (docking) de ligands sur un récepteur permettent de rationaliser / prédire la spécificité et l'affinité du récepteur pour différents odorants. Les techniques de simulation utilisées seront validées à l'aide des couples récepteur-ligands (ou familles de ligands) déterminés expérimentalement, ou par mutagenèse dirigée (BOG), puis employées pour effectuer un criblage *in silico* en termes de fonction chimique, taille, branchement, encombrement stérique,... afin de proposer des ligands potentiels à tester expérimentalement.

D'autres simulations de dynamique moléculaire du récepteur entier, en présence et en absence de ligand, avec ou sans contribution des lipides membranaires, peuvent permettre d'étudier le

mécanisme moléculaire responsable de la transduction du signal (analyse des modes normaux), mais nécessitent un investissement en temps plus conséquent.

Références à nos travaux

- Tromelin A et al., *J. Agric. Food Chem.* (2003) 51, 1977-1983
- Briand L et al., *Biochemistry* (2002) 41, 7241-7252
- Briand L et al., *Eur. J. Biochem.* (2000) 267, 3079-3089
- Nespoulous et al., *Chemical Senses* (2004) sous presse
- Da Silva S, Mémoire de DU, 1^{ère} année d'Ecole Doctorale, Université Versailles-Saint Quentin, 2001
- Levasseur G et al., *Eur. J. Biochem.* (2003) 270, 2905-2912

Demande de soutien

Post-doc NOPA/MIG : bioinformatique (modélisation des récepteurs olfactifs, docking moléculaire et dynamique moléculaire) ou doctorant

3. CONTRIBUTION DU GROUPE THEMATIQUE TRANSFERT ET TRANSDUCTION

Equipes impliquées dans ce groupe thématique

UR Biométrie et Intelligence artificielle, INRA Jouy-en-Josas : Kiên Kiêu (kieu@banian.jouy.inra.fr), Jean-Pierre Rospars² (rospars@versailles.inra.fr).

UR Neurobiologie de l'Olfaction et de la Prise Alimentaire, INRA Jouy-en-Josas : Edith Pajot (pajot@diamant.jouy.inra.fr).

UMR Neurosciences et Systèmes sensoriels, Université Lyon 1 : Patricia Duchamp-Viret (pduchamp@olfac.univ-lyon1.fr).

UMR Fractionnement des Agro-ressources et Emballages, INRA Reims : Jérôme Lezervant (Jerome.Lezervant@reims.inra.fr), Olivier Vitrac (olivier.vitrac@reims.inra.fr).

UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, INRA-INAPG Thiverval-Grignon : Eric Latrille (latr@grignon.inra.fr), Isabelle Souchon (souchon@grignon.inra.fr), Cristian Trelea (trelea@grignon.inra.fr), Michèle Marin (marin@grignon.inra.fr)

UR Phytopharmacie et Médiateurs chimiques, INRA Versailles : Mathieu Coppey (Mathieu.Coppey@versailles.inra.fr, coppey@lptl.jussieu.fr), Philippe Lucas (plucas@versailles.inra.fr), Jean-Pierre Rospars¹ (rospars@versailles.inra.fr).

Objectifs

Les déplacements moléculaires jouent un rôle clé dans la préservation des aliments (contexte de sécurité alimentaire) et les mécanismes de la perception olfactive (contexte neurobiologique). Dans le cas des aliments, on étudie les *transferts* de molécule (arôme ou autres) à partir des aliments en bouche et entre l'emballage et les aliments. Dans le cas de la *transduction* des signaux olfactifs par les neurones sensoriels olfactifs, on étudie des protéines membranaires (protéine G, enzymes, canaux ioniques) ou des seconds messagers cytoplasmiques (par ex. AMP cyclique, ion calcium) dont la diffusion, au sein de la membrane ou du cytoplasme, joue un rôle essentiel dans la réponse du neurone. Dans les deux cas il s'agit de modéliser ces déplacements moléculaires.

Méthodes

Les méthodes utilisées sont très semblables quels que soient la molécule étudiée et le milieu dans lequel elle se trouve (emballage, aliment, bouche, mucus, membrane cellulaire, cytoplasme,

stimulateur olfactif). Elles visent à décrire les mouvements moléculaires, notamment par diffusion, à différentes échelles (moléculaire, mésoscopique et macroscopique) et dans différentes conditions (d'un très petit nombre de molécules en jeu à un grand nombre). Elles reposent sur des traitements analytiques déterministes ou stochastiques et sur des simulations numériques plus ou moins intensives suivant les buts recherchés (précision de la description et nombre de molécules en jeu). Classiquement, les problèmes s'expriment par des systèmes d'équation différentielles faisant intervenir les variables d'espace et de temps (Rospars et al. 2003a, b). De nouvelles méthodes de calcul numérique intensif utilisent des approches de simulation particulière permettant de décrire des géométries beaucoup plus complexes que l'approche classique.

Expérimentation

Les modélisations que nous avons entreprises sont en général associées à une expérimentation qui vise la vérification des modèles ou la mesure de leurs paramètres. Parmi les techniques mises en œuvre on peut citer la mesure de coefficients de partage, de coefficients de diffusion (par ex. technique FRAP en microscopie confocale), de la réponse d'une population de neurones (par ex. concentration de calcium intracellulaire par spectrofluorimétrie, Levasseur et al. 2003) ou de neurones isolés (par ex. mesure de courants ioniques par la technique du "patch clamp", Lucas et al. 2003).

Références à nos travaux

Levasseur G, Persuy M-A, Grebert D, Remy J-J, Salesse R et Pajot-Augy E, *Eur. J. Biochem.* 270: 2905-12 (2003)
Lucas P, Ukhanov K, Leinders-Zufall T et Zufall F, *Neuron* 40: 551-561 (2003)
Rospars J-P, Krivan V et Lansky P, *Chem. Senses* 28: 509-522 (2003a)
Rospars J-P, Lansky P, Duchamp-Viret P et Duchamp A, *Eur. J. Neurosci.* 18: 1135-1154 (2003b)
Paçi Kora E, Souchon I, Latrille E, Martin N et Marin M, *J. Agriculture and Food Chemistry*, in press (2004)

Demandes de soutien

- a) Déplacements Lyon-Paris et Reims-Paris.
- b) DEA : contribution à l'analyse de données expérimentales (Versailles et Grignon).
- c) Doctorant ou post-doc spécialisé en physique théorique (diffusion) : dont contribution au développement de modèles de la transduction (Versailles).

4. CONTRIBUTION DU GROUPE THEMATIQUE CODAGE DES ODEURS COMPLEXES (MELANGES)

Equipes impliquées dans ce groupe thématique

UR Neurobiologie de l'Olfaction et de la Prise Alimentaire, INRA Jouy-en-Josas : Edith Pajot (pajot@diamant.jouy.inra.fr).

UMR Neurosciences et Systèmes sensoriels, Université Lyon 1 : Patricia Duchamp-Viret (pduchamp@olfac.univ-lyon1.fr).

UMR sur les Arômes, INRA Dijon : Anne Tromelin (Anne.Tromelin@dijon.inra.fr), Thierry Thomas-Danguin (thomasd@arome.dijon.inra.fr).

UMR Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, INRA-INAPG Thiverval-Grignon : Nathalie Martin (Nathalie.Martin@rdls.nestle.com).

UR Phytopharmacie et Médiateurs chimiques, INRA Versailles & Biométrie et Intelligence artificielle, INRA Jouy-en-Josas : Michel Renou (renou@versailles.inra.fr), Didier Rochat (rochatd@versailles.inra.fr), Jean-Pierre Rospars (rospars@versailles.inra.fr).

Objectifs

Le système olfactif est un système sensoriel dont les performances de détection et de discrimination sont très élevées. Les conditions expérimentales utilisées jusqu'à présent n'ont permis d'explorer qu'un versant restreint de ses capacités. En effet, pour des raisons évidentes de simplification, la plupart des études qui visaient à établir les bases cellulaires ou moléculaires du codage des odeurs ont utilisé des molécules simples comme stimulus. L'objectif présent est d'aborder le problème des odeurs complexes que sont la plupart des odeurs naturelles (odeurs alimentaires etc.).

Interactions entre composés d'un mélange

La première étape d'une approche de la compréhension du traitement cellulaire périphérique des odeurs complexes est une étape qui confronte les neurones récepteurs à des mélanges binaires. Les résultats d'une telle étude révèlent dès à présent que les réponses électrophysiologiques chez les Vertébrés et les Insectes témoignent de différents types d'interactions entre les deux molécules mises en présence. Les résultats obtenus en psychophysique pour l'homme, ou par des approches comportementales chez l'animal, sur l'évaluation quantitative et qualitative de la perception des mélanges binaires témoignent également de l'existence de telles interactions. Il est ainsi particulièrement intéressant de noter que pour décrire ces interactions, les physiologistes et les psychophysiciens s'accordent et parlent d'interactions intermoléculaires de type hypoaddition, synergie ou suppression lorsqu'ils analysent respectivement les réponses cellulaires ou les réponses des sujets humains.

Développements prévus

Il s'agit de comprendre plus avant comment, dès les premières étapes de la fonction olfactive lors de l'accrochage des molécules odorantes sur les protéines réceptrices, ont lieu des événements décisifs pour le codage d'un mélange binaire. Il faut pour cela prendre en compte les données déjà acquises par les outils électrophysiologiques et psychophysiques et poursuivre les tests sur des mélanges binaires communs aux deux outils pour analyser les interactions des molécules mises en présence. L'ensemble des données ainsi obtenues devrait permettre de décrire quantitativement les réponses de neurones stimulés par un mélange binaire. Un objectif plus ambitieux sera ensuite d'aborder la modélisation "explicative" des interactions entre les molécules du mélange et la population de récepteurs portés par le neurone récepteur. Ultérieurement, cette approche pourra être étendue à l'explication à des mélanges plus complexes que les mélanges binaires.

Références à nos travaux

- Duchamp-Viret P., Chaput M. et Duchamp A., *Science*, 284, 2171-2174 (1999).
Duchamp-Viret, P., Duchamp A. et Chaput M., *J. Neuroscience*, 20, 2383-2390 (2000).
Duchamp-Viret, P., Duchamp A. et Chaput M., *Eur J Neurosci.*, 18, 2690-2696 (2003).
Quero C, Bau J, Guerrero A. et Renou M., *Pest Manag. Sc.*, 6 (4), (sous presse) (2004).
Said I., Tauban D., Renou M., Mori K. et Rochat D., *J. Insect Physiol.* 49: 857-872 (2003).
Thomas-Danguin T. et Chastrette M., *CRAS*, 325, 767-772 (2002).

Demande de soutien

Déplacements Lyon-Paris et Dijon-Paris.